

# Povezanost polimorfizama gena za serotoninski transportni sustav s fenotipom Crohnove bolesti

---

**Grubelić Ravić, Katja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:362612>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Katja Grubelić Ravić**

**Povezanost polimorfizama gena za  
serotoninski transportni sustav s  
fenotipom Crohnove bolesti**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Katja Grubelić Ravić**

**Povezanost polimorfizama gena za  
serotoninski transportni sustav s  
fenotipom Crohnove bolesti**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2020.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkom zavodu za molekularnu dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Boris Vucelić, dr. med.

Rad sadrži: 192 stranice; 46 tablica; 42 slike i 408 referenci



## **ZAHVALA**

Zahvaljujem svim liječnicima i medicinskim sestrama Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju koji su mi pomagali u prikupljanju materijala.

Zahvaljujem se doc.dr.sc. Frani Paiću na pomoći u statističkoj obradi podataka.

Posebna zahvala mojem mentoru prof.dr.sc. Borisu Vucelić, koji mi je tijekom proteklih godina bio oslonac u svim medicinskim izazovima, na konstantnom nastojanju da učinimo više i bolje.

Hvala mojoj obitelji - roditeljima Gracijeli i Tihomilu, mojem suprugu Mariu i mojim sinovima Grguru i Lovri koji su mi stalna životna motivacija.

# Sadržaj

## POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

1. Uvod.....	1
1.1. Upalne bolesti crijeva.....	2
1.1.1. Ulcerozni kolitis .....	5
1.1.2. Crohnova bolest.....	23
1.2. Incidencija i prevalencija upalnih bolesti crijeva .....	54
1.3. Etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva.....	61
1.3.1. Čimbenici okoliša .....	62
1.3.2. Mikrobiom.....	64
1.3.3. Genetika .....	66
1.4. Neuroimunološke interakcije .....	71
1.4.1. Serotonin (5-HT/ 5-Hidroksitriptamin).....	72
1.4.2. Uloga serotonina u probavnom sustavu .....	75
1.4.3. SERT transporter .....	82
2. HIPOTEZA .....	86
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	87
4. MATERIJALI I METODE .....	89
4.1. Ispitanici.....	90
4.2. Izolacija genomske DNA.....	92

4.3. Genotipizacija SERT/SLC6A4 polimorfizma.....	94
4.4. Statistička obrada podataka.....	96
5. REZULTATI.....	99
5.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanika.....	100
5.2. Povezanost 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena i Crohnove bolesti .....	102
5.3. Analiza povezanost 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena s fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti.....	113
5.4. Analiza haplotipova 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena .....	121
6. RASPRAVA .....	123
7. ZAKLJUČAK.....	137
8. SAŽETAK.....	139
9. SUMMARY.....	141
10. LITERATURA.....	143
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	190

## POPIS OZNAKA I KRATICA

**5-HIAA** - (engl. 5-hydroxy-indol-acetic acid)

**5-HT** - Serotonin (engl. 5-hydroxytryptamine)

**5-HTR** – (engl. Serotonergic receptors)

**5-HTTLPR** - SERT-vezana polimorfna regija (engl. SERT gene-linked polymorphic region )

**AADC** - (engl. Aromatic amino acid decarboxylase)

**AAMP** - (engl. Angio Associated Migratory Cell Protein)

**ADO** - (engl. 2-Aminoethanethiol Dioxygenase)

**AhR** - (engl. Aryl hydrocarbon receptor)

**AI** - (engl. Activity Index – Seo indeks)

**AK2** - (engl. Adenylate Kinase 2)

**ANS** - autonomni nervni sustav

**AP2** - (engl. Activator protein 2)

**AQP12A** - (engl. Aquaporin 12A)

**AQP12B** - (engl. Aquaporin 12B)

**ARPC2** - (engl. Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 2)

**ATG16L1** - (engl. Autophagy Related 16 like 1)

**BACH2** – (engl. BTB Domain and CNC Homolog 2)

**BMI** - Indeks tjelesne mase (engl. Body Mass Index)

**bp** - parovi baza (engl. Base pairs)

**CaCo-2** - kontinuirana imortalizirana heterogena stanična linija adenokarcinomskih epitelnih stanica ljudskog kolona

**cADPR** - (engl. Cyclic adenosine diphosphate ribose)

**CAI** - (engl. Clinical Activity Index – Rachmilewitezев indeks)

**cAMP** - (engl. Cyclic adenosine monophosphate)

**CAPN10** - (engl. Calpain 10)

**CARD9** - (engl. Caspase Recruitment Domain Family Member 9)

**CCL11** - (engl. C-C Motif Chemokine Ligand 11)

**CCL2** - (engl. C-C Motif Chemokine Ligand 2)

**CCL7** - (engl. C-C Motif Chemokine Ligand 7)

**CCL8** - (engl. C-C Motif Chemokine Ligand 8)

**CCR6** - (engl. C-C Motif Chemokine Receptor 6)

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

**CDAI** - Indeks aktivnosti Crohnove bolesti (engl. Crohn's disease activity index)

**CDEIS** - Endoskopski indeks aktivnosti Crohnove bolesti (engl. Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity)

**CDH1** - (engl. Cadherin 1)

**CDKAL1** - (engl. CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1 Like 1)

**CDMI** - (engl. Crohn's disease MRI index)

**CECDAI** - (engl. Capsule Endoscopy Crohn's Disease Activity Indeks)

**CEP72** - (engl. Centrosomal Protein 72)

**CGHAS** - (engl. Colonic Global Histologic Disease Activity Score)

**CI** - (engl. confidence interval)

**CNS** - (engl. Central nervous system)

**CPEB4** - (engl. Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4)

**CREM** - (engl. CAMP Responsive Element Modulator)

**CRF** - (engl. Corticotrophin releasing factor)

**CRP** - C reaktivni protein (engl. C reactive protein)

**CUL2** - (engl. Cullin 2)

**CVS** - (engl. Cardiovascular system)

**CXCR1/IL8RA** - (engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 1/Interleukin-8 Receptor Type 1)

**CXCR2/IL8RB** - (engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 2/ Interleukin-8 Receptor Type 2)

**DAI** - (engl. Disease activity index)

**DAP** - (engl. Death Associated Protein)

**DCs** - (engl. Dendritic cells)

**df** - (engl. Degrees of freedom)

**DLD** - (engl. Dihydrolipoamide Dehydrogenase)

**DNMT3A** - (engl. DNA Methyltransferase 3 Alpha)

**DNND1B** - (engl. DENN Domain Containing 1B)

**DSS** - (engl. Dextran sodium sulphate)

**EAI** - (engl. Endoscopic Activity Index)

**EC** - enterokromafine stanice crijeva

**ECCO** - Europsko društvo za Crohnovu bolest i kolitis (engl. European Crohn's and Colitis Organization)

**ECM1** – (engl. Extracellular Matrix Protein 1)

**EDTA** - (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)

**EIMs** - Ekstraintestinalne manifestacije (engl. Extraintestinal manifestations)

**EIMs** - Ekstraintestinalne manifestacije (engl. Extraintestinal manifestations)

**EMSY** - (engl. EMSY Transcriptional Repressor, BRCA2 Interacting)

**EN** - Nodozni eritem (engl. Erythema nodosum)

**ENS** - (engl. Enteric nerve system)

**EO-IBD** - IBD unutar prvih 10 godina života (engl. Early onset of IBD)

**EQ-5D** - EuroQol-5D

**ERAP2** – (engl. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2)

**ERRFI1** – (engl. ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1)

**ESP** - Europsko društvo za patologiju (engl. European Society of Pathology)

**ESR** - Razina sedimentacije eritrocita (engl. Erythrocyte sedimentation rate)

**FADS1** - (engl. Fatty Acid Desaturase 1)

**FASLG** – (engl. Fas Ligand)

**FCGR2A** - (engl. Fc Fragment Of IgG Receptor IIa)

**FCGR2B** - (engl. Fc Fragment Of IgG Receptor IIb)

**FUT2** - (engl. Fucosyltransferase 2)

**GCKR** – (engl. Glucokinase Regulator)

**GI** – gastrointestinalni

**GNA12** - (engl. G Protein Subunit Alpha 12)

**GOT1** - (engl. Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1)

**GPX1** - (engl. Glutathione Peroxidase 1)

**GPX4** - (engl. Glutathione Peroxidase 4)

**GS** - (engl. Geoboes Index)

**H&E** - bojanje hemalaun eozinom

**HBI** - Harvey-Bradshawov jednostavni indeks aktivnosti Crohnove bolesi

**HINT1** - (engl. Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1)

**HLA-C** - (engl. Major Histocompatibility Complex, Class I, C)

**HNF4A** - (engl. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha)

**HPA** - hipotalamo-hipofizno-adrenergičnu osovina

**HRP** - (engl. Hormone replacement therapy)

**HSPA6** - (engl. Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6)

**IBD** - upalne bolesi crijeva (engl. Inflammatory Bowel Diseases)

**IBD-C** - (engl. Constipation predominant irritable bowel syndrome)

**IBDQ** - (engl. Inflammatory Bowel Disease Questionnaire)



**IBD-U** - neklasificirana upalna boleest crijeva (engl. Inflammatory Bowel Disease Unclassified)

**IBS** - (engl. Irritable bowel syndrome)

**IBS-D** - (engl. Diarrhea predominant irritable bowel syndrome)

**IBS-M** - (engl. Mixed type of irritable bowel syndrome)

**IC** - neodređeni kolitis (engl. Indeterminate colitis)

**ICOSLG** - (engl. Inducible T cell costimulator ligand)

**IFNY** - Interferon gama

**IgA** - imunoglobulin A

**IGHAS** - ( engl. Ileal global histologic disease activity score)

**IKZF1** - (engl. IKAROS Family Zinc Finger 1)

**IL10** - ( engl. Interleukin 10)

**IL12B** - (engl. Interleukin 12B)

**IL18RAP** - (engl. Interleukin 18 Receptor Accessory Protein)

**IL1R1** - (engl. Interleukin 1 Receptor Type 1)

**IL1R2** - (engl. Interleukin 1 Receptor Type 2)

**IL1 $\beta$**  - ( engl. Interleukin 1 beta)

**IL2** - ( engl. Interleukin 2)

**IL21** - (engl. Interleukin 21)

**IL23R** - (engl. Interleukin 23 Receptor)

**IL26** - (engl. Interleukin 26)

**IL27** - (engl. Interleukin 27)

**IL2RA** - (engl. Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha)

**IL5** - (engl. Interleukin5)

**IL6** - (engl. Interleukin 6)

**IL7R** - (engl. Interleukin 7 Receptor)

**IL8RA/CXCR1** - (engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 1/ Interleukin 8 Receptor, Alpha)

**IL8RB/CXCR2** - (engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 2/ Interleukin 8 Receptor, Beta)

**ILC3** - (engl. Type 3 innate lymphoid cells)

**INAVA** - (engl. Innate Immunity Activator)

**IO-IBD** - Infantilni IBD – unutar prvih 2 godine života [eng. Infantile (and toddler) onset IBD]

**IP3** - (engl. Inositol trisphosphate)

**IPAA** - (engl. Ileal pouch anal anastomosis)

**IQR** - (engl. Interquartile range)

**IRF5** - (engl. Interferon Regulatory Factor 5)

**IRGM** - (engl. Immunity Related GTPase M)

**ITLN1** - (engl. Intelectin 1)

**JAK2** - (engl. Janus Kinase 2)

**Kb** - (engl. Kilobase pairs)

**KIF21B** - (engl. Kinesin Family Member 21B)

**LAMB1** - (engl. Laminin Subunit Beta 1)

**LD** - (engl. Linkage disequilibrium)

**LI** - Lewisov indeks endoskopske aktivnosti upalne reakcije u tankom crijevu (engl. Lewis capsule Endoscopy Scoring Systems)

**LINC00548** - (engl. Long intergenic non-protein coding RNA 548)

**LNPEP** - (engl. Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase)

**LR** - (engl. Likelihood ratio)

**LRRK2** - (engl. Leucine Rich Repeat Kinase 2)

**LSP1** - (engl. Lymphocyte Specific Protein 1)

**MAO** - (engl. monoamine oxidase)

**MaRIA** - (engl. Magnetic resonance index of activity)

**MC** - mikrokolitis

**MEGS** - (engl. Magnetic resonance enterography global score)

**MES** - (engl. Mayo Endoscopic Subscore)

**MRI** - (engl. Magnetic resonance imaging)

**MST1** - (engl. Macrophage Stimulating 1)

**MTWSI** - (engl. Modified Truelove and Witts Severity Index; Lichtigerov indeks)

**MUC1** - (engl. Mucin 1)

**MUC19** - (engl. Mucin 19)

**NDFIP1** - (engl. Nedd4 Family Interacting Protein 1)

**NF- κB** - (engl. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

**NGS** - (engl. Next generation DNA sequencing).

**NI** - (engl. Nancy Index)

**NK** - (engl. Natural killer cells)

**NKX2-3** - (engl. NK2 Homeobox 3)

**NLR** - (engl. NOD-like receptors)

**NOD2/CARD15** - (engl. Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2/Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15)

**NO-IBD** - Neonatalni IBD –unutar prvih 28 dana života [engl. Neonatal onset IBD]

**NRIP1** - (engl.

**NSAID** - (engl. Non steroid anti-inflammatory drugs)

**OCP** - (engl. Oral contraceptives)

**OMGE** - (engl. Organisation Mondiale Gastro-Entérologie)

**OR** - (engl. odds ratio)

**ORF** - (engl. Open reading frame)

**ORMDL3** - (engl. ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3)

**OTUD3** - (engl. OTU Deubiquitinase 3)

**pANCA** - Perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska protutijela

**PARD3** - (engl. Par-3 Family Cell Polarity Regulator)

**PARK7** - (engl. Parkinsonism Associated Deglycase)

**PDAI** - Perianalni indeks aktivnosti Crohnove bolesti (engl. Perianal Disease Activity Index)

**PDR** - (engl. Patient-defined remission)

**PEX13** - (engl. Peroxisomal Biogenesis Factor 13)

**PGA** - (engl. Physician's Global Assessment)

**PIM3** - (engl. Pim-3 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase)

**PLA2G2E** - (engl. Phospholipase A2 Group IIE)

**PNS** - (engl. Peripheral nerve system)

**PPP** - (engl. Platelet pure plasma)

**PRDM1** - (engl. PR/SET Domain 1)

**PRDX5** - (engl. Peroxiredoxin 5)

**PROMs** - (engl. Patient reported outcome measures)

**PSMG1** - (engl. Proteasome Assembly Chaperone 1)

**PTGER4** - (engl. Prostaglandin E Receptor 4)

**PTPN2** - (engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2)

**PTPN22** - (engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22)

**PUCAI** - Pedijatrijski indeks ulceroznog kolitisa(engl. The Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index)

**PUS10** - (engl. Pseudouridine Synthase 10)

**qRT-PCR** - (engl. Quantitative real time polymerase chain reaction)

**RA** - Retinoična kiselina (engl. retinoic acid)

**RBCLB** - (engl. Red blood cell lysis buffer)

**REL** - (engl. REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit)

**RHI** - (engl. Robarts Histopathologic Index)

**RPL3** - (engl. Ribosomal Protein L3)

**RTEL1** - (engl. Regulator of Telomere Elongation Helicase 1)

**SBCE** - (engl. Small bowel capsule endoscopy)

**SBE** - (engl. Small bowel enteroclysis)

**SBFT** - (engl. Small bowel flow - through)

**SBNO2** - (engl. Strawberry Notch Homolog 2)

**SCAD** - segmentalni kolits povezan sa divertikulozom (engl. Segmental colitis associated with diverticulosis)

**SCAMP3** - (engl. Secretory Carrier Membrane Protein 3)

**SCCAI** - (engl. Simple Clinical Colitis Activity Index)

**SCFA** - kratkolančane masne kiseline (engl. Short chain fat acids)

**SERINC3** - (engl. Serine Incorporator 3)

**SERT/5-HTT/SLC6A4** - transporter za ponovni/povratni unos serotonina (engl. Serotonin reuptake transporter)

**SES-CD** - Jednostavni endoskopski bodovni system za Crohnovu bolest (engl. Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease)

**SLC11A1** - (engl. Solute Carrier Family 11 Member 1)

**SLC22A4** - (engl. Solute Carrier Family 22 Member 4)

**SLC22A5** - (engl. Solute Carrier Family 22 Member 5)

**SLC26A3** - (engl. Solute Carrier Family 26 Member 3)

**SLC2A4R** - (engl. SLC2A4 Regulator)

**SLC9A3** – ( engl. Solute Carrier Family 9 Member A3)

**SLC9A4** - (engl. Solute Carrier Family 9 Member A4)

**SMAD3** - (engl. SMAD Family Member 3)

**SMR** - Standardizirana omjer mortaliteta = opažena smrtnost /očekivana smrtnost (engl. Standardized mortality ratio)

**SNP** - (engl. Single nucleotide polimorphism)

**SP** - (engl. Substance P)

**SP140** - (engl. SP140 Nuclear Body Protein)

**SSBO** - (engl. Small bowel bacterial overgrowth)

**SSRI** - (engl. Selective serotonin reuptake inhibitors)

**STAT3** - ( engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

**TAGAP** - (engl. T cell Activation RhoGTPase Activating Protein)

**TGFβ** - (engl. Transforming growth factor beta)

**TH1** - (engl. Type 1 T helper cells)

**TH17** - ( engl. Type 17 T helper cells)

**THADA** - (engl. THADA Armadillo Repeat Containing)

**TLR** - (engl. Toll-like receptors)

**TNBS** - (engl. Trinitrobenzene sulfonic acid)

**TNFRSF14** - (engl. TNF Receptor Superfamily Member 14)

**TNFRSF6B** - (engl. TNF Receptor Superfamily Member 6b)

**TNFRSF9** - (engl. TNF Receptor Superfamily Member 9)

**TNFSF11** - (engl. TNF Superfamily Member 11)

**TNFSF15** - (engl. TNF Superfamily Member 15)

**TNFSF8** - (engl. TNF Superfamily Member 8)

**TPH 1/2** – Triptofan hidroksilaza 1 i 2

**TPPP** - (engl. Tubulin Polymerization Promoting Protein)

**TLL8** - (engl. Tubulin Tyrosine Ligase Like 8)

**TYK2** - (engl. Tyrosine Kinase 2)

**UC** - ulcerozni kolitis (engl. Ulcerative Colitis)

**UCCIS** - (engl. Ulcerative Colitis Colonoscopic Index of Severity)

**UCCS** - (engl. Ulcerative Colitis Clinical Score; Feagan index - modificirani Baronov index)

**UCDAI** - (engl. UC Disease Activity Index)

**UCEIS** - validirani endoskopski indeks aktivnosti ulceroznog kolitisa (engl. Ulcerative colitis index of severity)

**UGI** - gornji gastrointestinalni trakt (engl. Upper gastrointestinal tract)

**UTS2** - (engl. Urotensin 2)

**VAMP3** - (engl. Vesicle Associated Membrane Protein 3)

**VAS** - (engl. Visual analog scale)

**VEO-IBD** - IBD unutar prvih 6 godina života (engl. Very early onset of IBD)



**VHI** - Van Heesov indeks (Nizozemski indeks) za procjenu aktivnosti Crohnove bolesti

**VMAT 1/2** - Vezikularni monoamin transporter 1 i 2

**VNTR** - (engl. Variable number of tandem repeats)

**WBC** - Bijele krvne stanice (engl. White blood cells)

**WBCLB** - (engl. White blood cell lysis buffer)

**XPB1** - (engl. X-Box Binding Protein 1)

**YDJC** - (engl. YdjC Chitooligosaccharide Deacetylase Homolog)

**ZMIZ1** - (engl. Zinc Finger MIZ-Type Containing 1)

**ZNF300** - (engl. Zinc Finger Protein 300)

**ZNF365** - (engl. Zinc Finger Protein 365)

**ZPF36L1** - (engl. RNA binding protein ZPF36L1)

$\chi^2$  - Hi kvadrat test

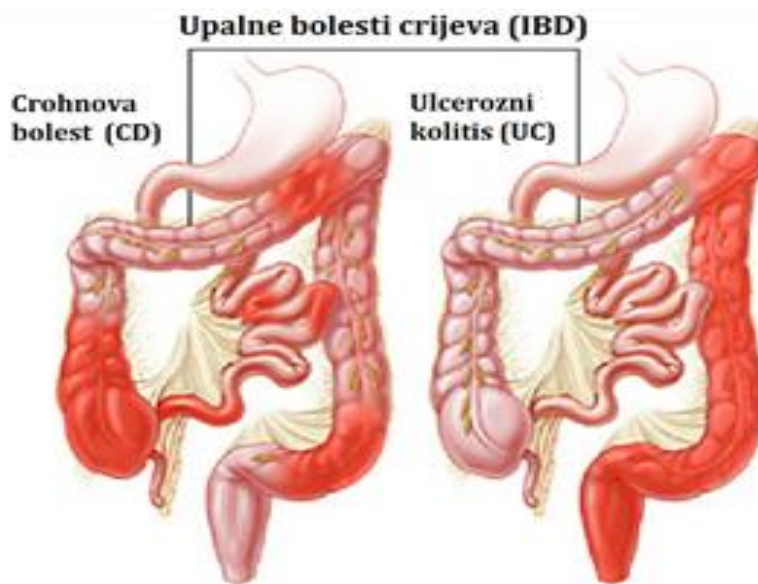
# **1. UVOD**

## 1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (IBD; engl. *Inflammatory bowel diseases*) predstavljaju heterogenu skupinu idiopatskih kroničnih upalnih bolesti koje mogu zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog (GI) sustava (1-5). Osobe s ovim stanjima često doživljavaju razdoblja simptomatskih egzacerbacija/relapsa i remisije, a ozbiljnost kliničke slike ovisi o sijelu upalne lezije, o proširenosti upalnih promjena, o aktivnosti bolesti, o zahvaćenosti susjednih struktura i organa te pojavi ekstra intestinalnih i sistemskih komplikacija (6-8).

Dvije glavne kategorije bolesti su Crohnova bolest (CD; engl. *Crohn's disease*) i ulcerozni kolitis (UC; engl. *Ulcerative colitis*) koji se preklapaju i imaju različita klinička i patološka obilježja (Tablica 1.1) (1-5).

Pri tome ulcerozni kolitis karakterizira kontinuirana kronična upala sluznice debelog (kolon) i završnog dijela crijeva (rektum) dok Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, od usne šupljine do anusa (Slika 1.1).



**Slika 1.1 Područja probavnog sustava zahvaćena Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom.** Ulcerozni kolitis karakterizira kontinuirana kronična upala sluznice (upala je ograničena na sluznicu te u manjoj mjeri na submukozu) debelog (kolon) i završnog dijela crijeva (rektum) dok Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, od usne šupljine do anusa (diskontinuirani/segmentalni upalni proces- najčešće u terminalnom ileumu i cekumu -kod kojeg se upalne promjene protežu kroz cijelu debljinu stijenke crijeva pri čemu se između zahvaćenih segmenata nalaze područja zdrave sluznice stvarajući, na taj način tzv. „skip“ lezije karakteristične za ovu bolest) Modificirano Prema: <https://iconsinmedicine.wordpress.com/2011/02/28/inflammatory-bowel-disease/>

**Tablica 1.1 Razlike u kliničkoj prezentaciji Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i neodređenog kolitisa.**

Prezentacija	Ulcerozni kolitis	Crohnova bolest	Neodređeni kolitis
<b>Pedijatrijski IBD (%)</b>	24–32	59–73	3–13
<b>Kliničke karakteristike</b>			
<i>Bol u abdomenu</i>	Uobičajeno	Uobičajeno	Uobičajeno
<i>Rektalno krvarenje</i>	Uobičajeno	Povremeno	Varijabilno
<i>Proljevi</i>	Uobičajeno	Uobičajeno	Uobičajeno
<i>Anemija</i>	Uobičajeno	Povremeno	Varijabilno
<i>Gubitak težine/zastoj u rastu</i>	rijetko	Uobičajeno	Varijabilno
<b>Proširenost bolesti</b>	Ograničeno na kolon, široko se proteže proksimalno od rektuma	Pošteđa sluznice rektuma, bilo koji dio probavne cijevi, od usne šupljine do anusa	Varijabilno
<b>Perianalne promjene</b>	Rijetko	Uobičajeno	Varijabilno
<i>Stenoza</i>	Rijetko	Uobičajeno	Varijabilno
<i>Apsces</i>	Rijetko	Uobičajeno	Varijabilno
<i>Fistula</i>	Rijetko	Uobičajeno	Varijabilno
<b>Endoskopske karakteristike</b>	Difuzna kontinuirana upala iz rektuma koja se proteže proksimalno	Diskontinuirana upalna žarišta s aftoznim ili longitudinalnim ulceracijama	Varijabilno
	Izgled sluznice poput "brusnog papira"	Aktivni ileitis	
	Frijabilna sluznica	Fisure, fistule i strikture	
	Mali površni ulkusi	Kaldrmast izgled (cobblestoning)	
	Moguća prisutnost gastritisa	Moguća prisutnost gastritisa	
<b>Histološke karakteristike</b>	Kriptalni apscesi	Granulomi	UC značajke uz odsutnost teškog kolitisa ali uz prisutnost transmuralne upalne reakcije
	Distorzija kripta	Distorzija kripta	UC značajke sa značajnim kašnjenjem rasta
	Upala ograničena na sluznicu	Transmuralna upala	UC karakteristike s prisutnošću ileitisa atipičnog za "backwash ileitis" ili diskontinuiranu upalnu reakciju
	Često se opaža periapendikularna upala s distalnim kolitisom	Kolitis s granulomatoznom upalom jednjaka, želuca ili dvanaesnika	Pankolitis s analnim fisurama
		Apsolutna pošteđa rektuma	UC značajke s makroskopski i mikroskopski očuvanom sluznicom rektuma
			Reverzni gradijent upale

*Modificirano prema: Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. Semin Pediatr Surg. 2017; 26:349-355. (2).*

Njihova dijagnoza temelji se na kliničkim, endoskopskim (kolonoskopija – rektoskopija / rektosigmoidoskopija; ezofagogastroduodenoskopija, a u slučaju negativne pasaže tankog crijeva i sumnje na CD i enteroskopija tankog crijeva odnosno endoskopija kapsulom),

radiološkim histološkim, i laboratorijskim nalazima te patohistološkoj analizi bioptata ili kirurškog materijala (1, 3, 5, 9). U otprilike 5-15 % IBD bolesnika prisutne upalne promjene debelog crijeva (endoskopska i histološka procjena) ne mogu se svrstati niti u ulcerozni kolitis niti u Crohnovu bolest te se tada govori o neklasificiranoj upalnoj bolesti crijeva (IBD-U, engl. *Inflammatory bowel disease unclassified*) odnosno neodređenom kolitisu (IC; engl. *indeterminate colitis*) (1, 3, 5, 9). IBD-U odnosno IC je posebice uobičajen kod pedijatrijskih pacijenata (tablica 1), osobito onih unutar VEO-IBD (engl. *Very early onset of IBD*) skupine (~1/4 pacijenata do 6 godine života te ~ 1/3 pacijenata do 3 godine života), nego li kod odraslih (~6%) pacijenata (10). Nadalje, kod nekih pacijenata vidljivo je značajno kliničko preklapanje između ova tri oblika IBD-a. Tako se u malom dijelu pacijenata početna dijagnoza ulceroznog kolitisa kasnije mijenja u IBD-U ili Crohnovu bolest (11-13).

Patogeneza bolesti je još uvijek nejasna no unatoč tome moguće je razlikovati kliničke, endoskopske i histološke karakteristike (tablica 1.2) te različite genetske, okolišne i patogene čimbenike odgovorne za etiologiju CD, UC te IBD-U/IC forme IBD-a. (14).

**Tablica 1.2 Stratifikacija pedijatrijskih IBD pacijenata prema godinama života.**

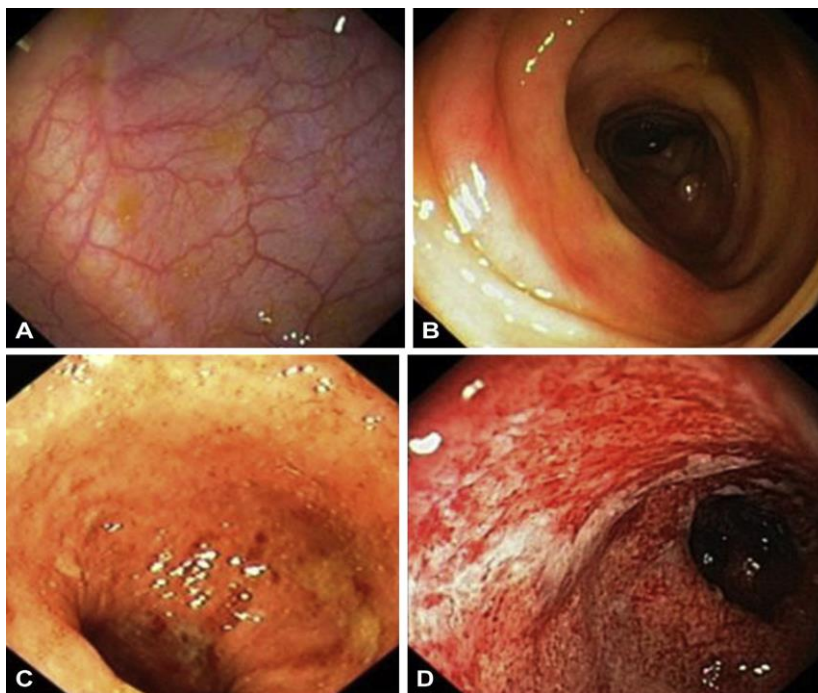
<b>Grupa</b>	<b>Klasifikacija</b>	<b>Dobna skupina</b>
<b><i>Pedijatrijski IBD</i></b>	Montreal A1	< 17 godina života
<b><i>EO-IBD</i></b>	Pariz A1a	< 10 godina života
<b><i>VEO-IBD</i></b>		< 6 godina života
<b><i>IO-IBD - Infantilni IBD</i></b>		< 2 godine života
<b><i>NO-IBD - Neonatalni IBD</i></b>		Prvih 28 dana života

*Montreal* klasifikacija je u dijagnozi IBD-a definirala tri dobne kategorije (A1 ≤16 godina, A2 = 17–40 godina, A3 > 40 godina) [5]. Naknadno *Pariški konsenzus* [4] klasificirao je dob pri dijagnozi kao A1a (0 do <10 godina), A1b (od 10 do <17 godina), A2 (17-40 godina) i A3 (> 40 godina). specifičnosti dječje značajke IBD-a. Unutar pedijatrijske skupine IBD pacijenata razlikujemo još pacijente sa EO-IBD, VEO-IBD, IO-IBD te NO-IBD podskupinom bolesti. Modificirano prema: Uhlig et al. *The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2014; 147:990-1007.e3.* (14).

### 1.1.1. ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis karakteriziran je kroničnom upalom sluznice koja počinje distalno u rektumu, s kontinuiranim proksimalnim produženjem, zahvaćajući pri tome samo jedan dio ili cijelo debelo crijevo (pankolitis), često s naglim razgraničenjem između upaljenih i neupaljenih dijelova sluznice (15-22). Pri tome je upalni proces ograničen na površinu sluznice te u manjoj mjeri na submukozu. Iznimka je fulminantni ulcerozni kolitis kod kojega se javljaju duboki ulkusi i transmuralna upala koja je za razliku od Crohnove bolesti ograničena na područja ulceracije (15-22).

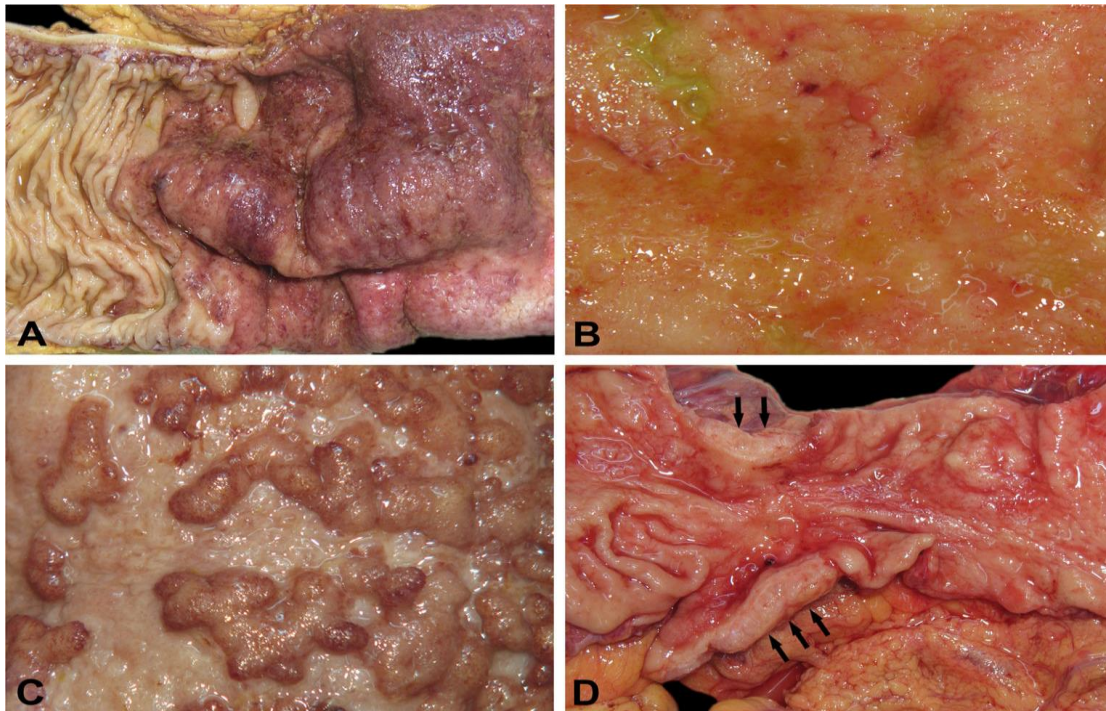
Makroskopski izgled sluznice varira ovisno o intenzitetu i proširenosti bolesti (Tablica 1.3, Slika 1.2 i 1.3 ). U ranijim fazama sluznica je eritematozna, sitno zrnasta i frijabilna, s gubitkom normalnog vaskularnog crteža i često s raspršenim hemoragičnim područjima uz pojavu krvarenja na sluznici (15-22).



**Slika 1.2 Endoskopski prikaz aktivnosti bolesti u UC.** (A) Normalan endoskopski izgled [MES Z 0 (MES - engl. Mayo Endoscopic Sub score)]. (B) Blagi oblik bolesti karakteriziran eritemom i gubitkom vaskularnog crteža (MES Z 1). (C) Umjereni oblik bolesti s frijabilnošću i erozijom sluznice (MES Z 2). (D) Teški oblik bolesti sa spontanom krvarenjem i ulceracijom (MES Z 3). Modificirano prema: Pai RK, et al. *The emerging role of histologic disease activity assessment in ulcerative colitis. Gastrointest Endosc.* 2018; 88:887-898. (21).



Nasuprot tome u težim oblicima bolesti sluznica je uz pojavu spontanog krvarenja izrazito hemoragična i edematozna te prožeta različito izraženim ulceracijama i erozijama koje zahvaćaju sluznicu i submukozu debelog crijeva a kao odraz procesa cijeljenja teških upalnih promjena uz hipertrofiju preostalih dijelova sluznice (rubovi sluznice oko ulceracija uzdižu se iznad razine okolnog tkiva; česti u sigmoidnom i silaznom dijelu debelog crijeva a rijetki u rektumu) nastaju inflamatorni pseudopolipi (15-22).



**Slika 1.3 Resekcijski uzorak ulceroznog kolitisa.** (a) Vidljiva difuzna, kronična upalna reakcija sa oštrim prijelazom između upaljene i normalne sluznice. (b) Frijabilan granulirani izgled sluznice sa površinskim ulceracijama. (c) Raširene ulceracije sa poštedom okolne sluznice dovode do nastanka upalnih polipa. (d) Dugotrajni upalni proces sa atrofičnom sluznicom bez haustracija te adenokarcinomom (strelice) unutar striktura. Preuzeto iz: Langner C, et al. *The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide.* *Virchows Arch.* 2014; 464(5):511-27., (22).

Kod fulminantnog kolitisa makroskopski izgled sluznice ne može se sa sigurnošću razlikovati od Crohnove bolesti a moguća je i pojava serozitisa (15-22). Kod netretiranih pedijatrijskih bolesnika (30%) te odraslih bolesnika sa fulminantnim kolitisom (13%) kao i kod pacijenata koji su primili topikalnu ili sistemsku terapiju (44%) moguća je pojava poštede rektuma (15-22). Osim toga kao rezultat terapije mogu se uočiti i područja mjestimično neupaljene sluznice (eng. *patchiness*) odnosno diskontinuirani raspored upalne reakcije (15-22).

**Tablica 1.3 Makroskopske karakteristike ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti**

<b>Makroskopske karakteristike</b>	<b>Ulcerozni kolitis</b>	<b>Crohnova bolest</b>
<i>Lokalizacija u GI sustavu</i>	Kolon i rektum	Cijeli GI sustav
<i>Ileum</i>	Samo kod tzv. „backwash-ileitis-a“	Često zahvaćen
<i>Kolon</i>	Lijevi > desni	Desni > lijevi
<i>Rektum</i>	Često zahvaćen	Tipično pošteđen
<i>Distribucija u GI sustavu</i>	Difuzna (kontinuirana)	Segmentalna (diskontinuirana)
<i>Ulceracije</i>	Površinska ulceracija	Aftoidne ulceracije, konfluentne duboke linearne ulceracije
<i>Pseudopolipi</i>	Česti	Neuobičajeni
<i>Diskontinuirane lezije (engl. “Skip-lesions”)</i>	Odsutne	Prisutne
<i>Kaldrmast “Cobblestone” izgled</i>	Odsutne	Prisutne
<i>Duboke fisure</i>	Prisutne samo u fulminantnom kolitisu	Prisutne
<i>Fistule</i>	Prisutne samo u fulminantnom kolitisu	Prisutne
<i>Atrofija mukoze</i>	Izrazita	Minimalna
<i>Debljina stijenke</i>	Normalna	Povećana
<i>Zadebljanje mezenterija (engl. fat wrapping)</i>	Odsutno	Prisutno
<i>Striktore</i>	Neuobičajene	Prisutne

*Modificirano prema: Magro F, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2013; 7:827–851, (15).*

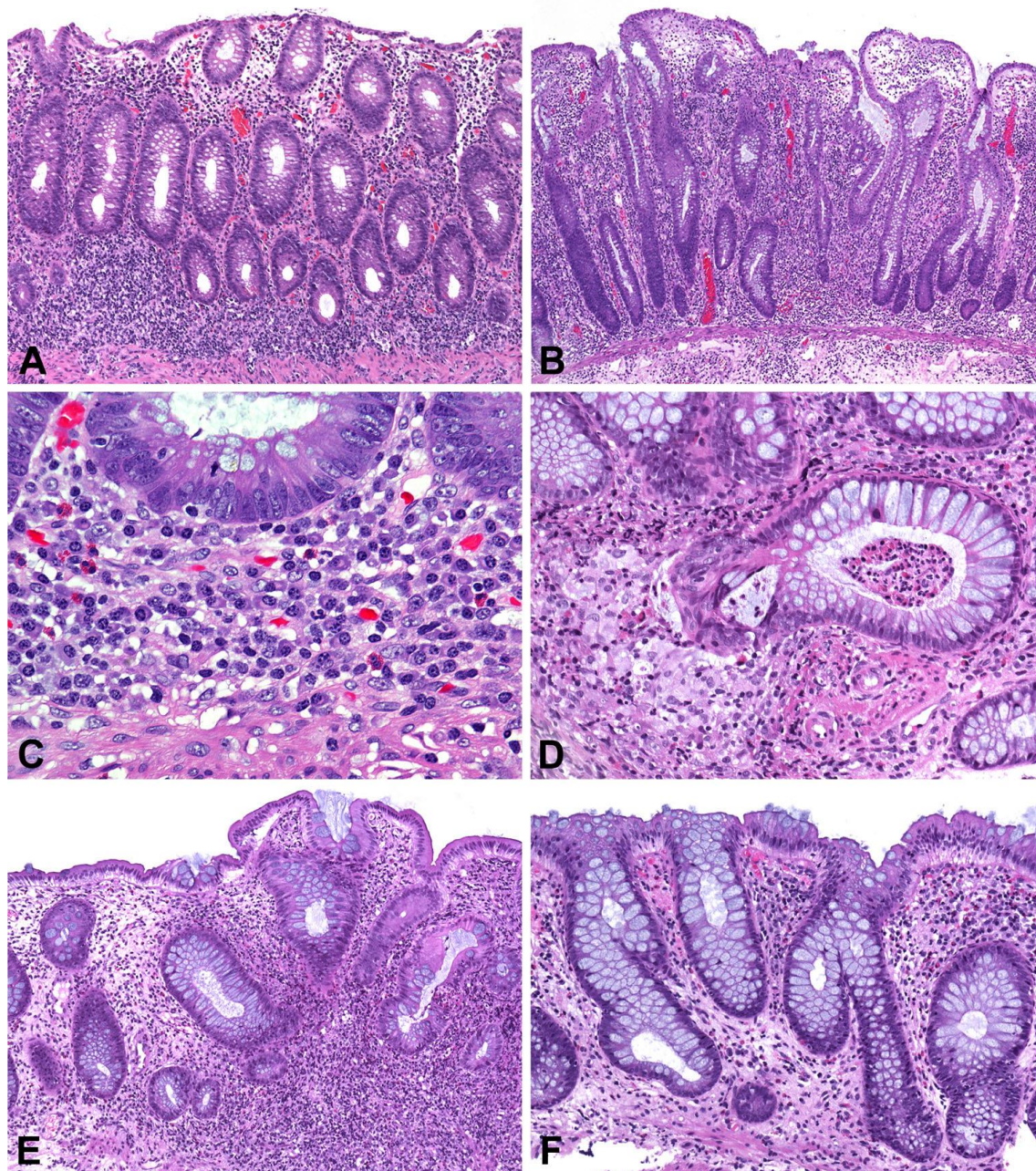
Osnovne mikroskopske karakteristike (Tablica 1.4; Slika 1.4) aktivne bolesti su poremećaj kriptalne arhitekture (skraćivanje, grananje, nepravilna raspodjela i atrofija kripti), kriptitis i kriptalni apscesi [češći kod ulceroznog kolitisa (41%) nego kod Crohnove bolesti (19%)], izražena redukcija mucina [smanjen broj vrčastih stanica (engl. *Goblet cells*) i/ili smanjena količina unutar-staničnog mucina] te upalne infiltracije [plazma stanice (primarno između lumena kripti i *muscularis mucosae*- bazalna plazmocitoza); eozinofili (prisutni u varijabilnom broju); limfociti; neutrofil – prisutni u lamini propriji i/ili dovode do pojave kriptitisa (prisutnost neutrofila unutar epitela kripti) ili kriptalnog apscesa (prisutnost neutrofila u lumenu kripti)] lamine proprije (15-22).



**Tablica 1.4 Mikroskopske karakteristike ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti**

<b>Mikroskopske karakteristike</b>	<b>Ulcerozni kolitis</b>	<b>Crohnova bolest</b>
<i>Poremećaj kriptalne arhitekture</i> <i>Kronična upala</i>	Difuzan (kontinuiran) Difuzna (kontinuirana) Proksimalno smanjivanje	Fokalan(diskontinuiran) Fokalna(diskontinuirana) Varijabilno
<i>Pojave mjestimično neupaljene sluznice</i> <i>(eng. patchiness)</i>	Neuobičajena	Uobičajena
<i>Lokalizacija upalnog procesa</i>	Površinska Transmukozna Ponekad u submukozi	Transmuralna
<i>Upala seroza</i>	Samo kod fulminantnog kolitisa	Prisutna
<i>Limfatični agregati</i>	Frekventni u sluznici, submukozi	Uobičajeni, transmuralni
<i>Granulomi</i>	Odsutni, osim kod rupturiranih kripti	Prisutni
<i>Akutna upala</i>	Difuzna (kontinuirana)	Fokalna(diskontinuirana)
<i>Polimorfni epitel kripti</i> <i>Kriptalni apscesi</i>	Difuzno (kontinuirano) Uobičajeni	Fokalno(diskontinuirano) Neuobičajeni
<i>Redukcija mucina</i>	Prisutna, naglašena	Neuobičajena, blaga
<i>Hiperplazija živčanih vlakana</i>	Rijetka	Uobičajena
<i>Mišićna hipertrofija</i>	Odsutna	Prisutna
<i>Metaplazija Panethovih stanica</i>	Prisutna	Neuobičajena
<i>Metaplazija Piloričnih žlijezda</i>	Rijetka	Prisutna

*Modificirano prema: Magro F, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2013; 7:827–851, (15)*



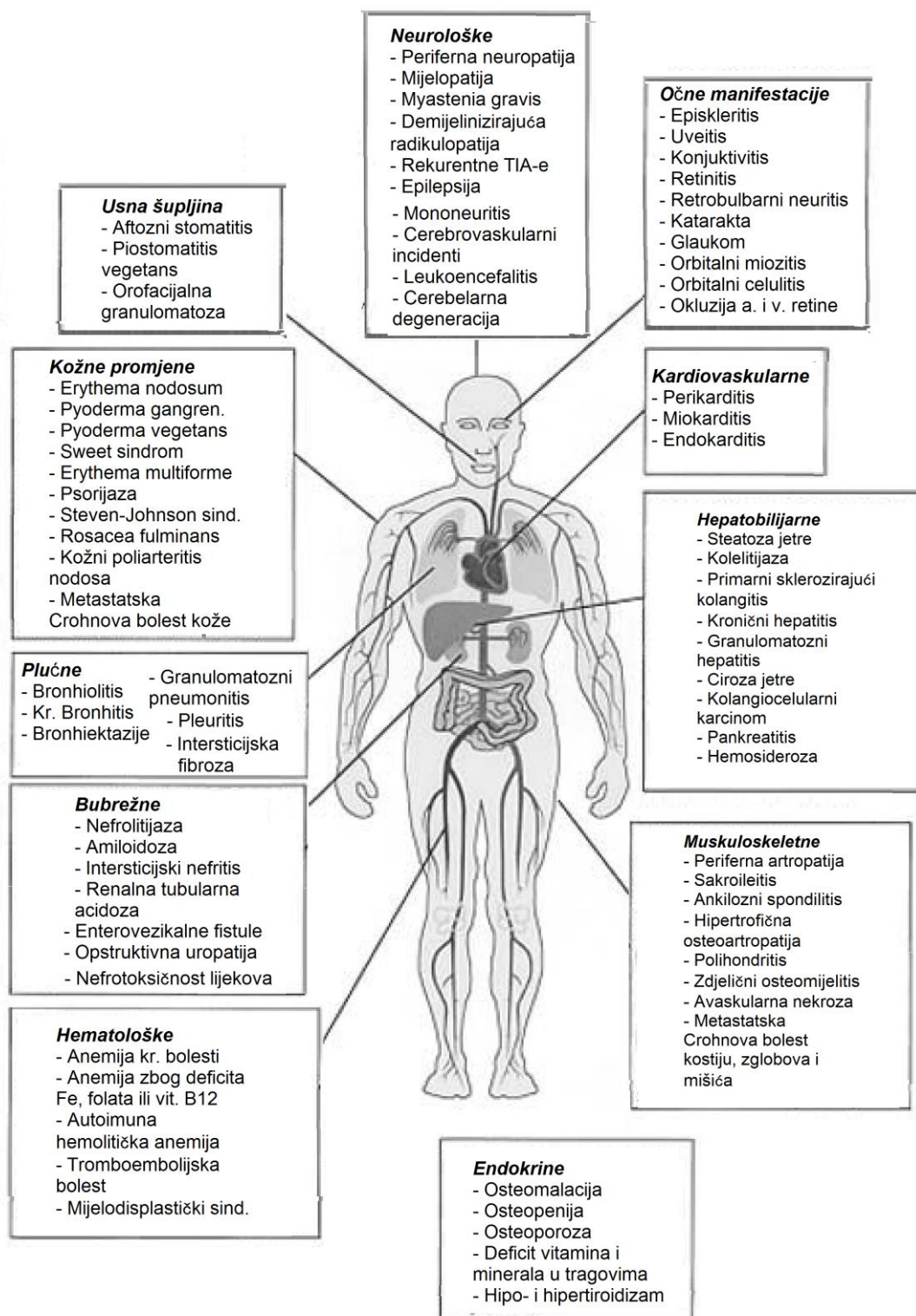
**Slika 1.4. Mikroskopske karakteristike ulceroznog kolitisa.** (A; povećanje 100 X) U ranom stadiju ulceroznog kolitisa vidljiva je difuzna (kontinuirana) upalna reakcija uz prisustvo bazalne plazmocitoze ali uz blagu atrofiju kripti (skraćivanje ili tzv. 'gland lift-off'). (B; povećanje 75 X) U dugotrajnom stadiju bolesti vidljiva izrazita atrofija i grananje crijevnih kripti (C; povećanje 400X) Plazma stanice dominantno raspoređene između baze crijevnih kripti i muscularis mucosae (tzv. bazalna plazmacitoza). (D; povećanje 250 X) Aktivnost bolesti indicirana kriptitisom i stvaranjem kriptalnih apscesa koji mogu dovesti do destrukcije crijevnih kripti i granulomatozne reakcije (tzv. kriptolitički granulomi)- ne smiju se zamijenit sa karakteristikama Crohnove bolesti (E; povećanje 150 X) Pojave mjestimično neupaljene sluznice (eng. Patchiness) kod dugotrajne bolesti. (F; povećanje 150 X) Izrazita distorzija arhitekture crijevnih kripti uz hipoceluarnost strome kod bolesti u kliničkom mirovanju. Preuzeto iz: Langner C, et al. *The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide.* *Virchows Arch.* 2014; 464(5):511-27., (22).

Premda u fazama remisije sluznica može izgledati normalno, ona je kod dugotrajnije bolesti obično blijeda i atrofična. Kod kronične upalne reakcije može doći i do metaplazije Panethovih stanica (pogotovo kod ljevostranog kolitisa), hipertrofije mišićnog sloja (*muscularis mucosae*) te u rjeđim slučajevima do submukozne fibroze (15-22). Usljed izmjenjivanja remisija i egzacerbacija/relapsa bolesti dolazi do retrakcije longitudinalnog sloja mišićnih vlakana odnosno skraćanja crijeva. Zbog ožiljnih promjena na ulceracijama može doći i do stvaranja fibroznih striktura no kako one nisu klasična manifestacija ulceroznog kolitisa njihova pojava uvijek treba pobuditi sumnju na prisutnost kolorektalnog karcinoma sve dok se histološkom analizom bioptata ili resekcijskog uzorka tkiva ne dokaže suprotno.

Glavni klinički simptom UC-a je rektalno krvarenje (usko povezano s upalnim promjenama rektalne sluznice) odnosno pojava krvavih stolica obično pomiješanih sa sluzi i gnojem (pomiješani sa stolicom ili prisutni po površini stolice), a ovisno o proširenosti upale na proksimalnije dijelove debelog crijeva prisutni su proljevi (izraženiji što je veći dio debelog crijeva zahvaćen upalom), bol u truhu (kolike ili grčevi, osobito ako se radi o ekstenzivnijem obliku bolesti koji zahvaća proksimalnije dijelove debelog crijeva), tenezmi ili urgencije (grčeviti, bolni nagoni na defekaciju ili osjećaj nepotpunog pražnjenja crijeva koji se javljaju i kada je prazan distalni dio debelog crijeva) koji mnogo puta ne rezultiraju stolicom pa ih nazivamo „lažnim pozivima” (1-3, 9, 17 – 20). Sistemski simptomi (izraženiji kod težih oblika bolesti) uključuju anoreksiju i mučnine te katkada povraćanje, gubitak na težini i hipoalbuminemiju, vrućicu, noćno preznojavanje i simptome (umor, dispneja) anemije (1-3, 9, 17–20).

Moguće su i ekstraintestinalne manifestacije (EIM; engl. **ExtraIntestinal Manifestations**) bolesti [povremene ili trajne upalne promjene na organima izvan probavne cijevi koje koreliraju (periferni artritis, nodozni eritem, gangrenozna pioderma i episkleritis) ili ne koreliraju (primarni sklerozirajući kolangitis, uveitis, ankilozirajući spondilitis i sakroileitis) s intenzitetom upale crijeva (slika 1.5) (1-3, 9, 17–20, 23).





**Slika 1.5 Ekstraintestinalne manifestacije upalnih bolesti crijeva.** Modificirano prema: Ricart E., Sandborn W.J. (2003) *Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease*. In: Cohen R.D. (eds) *Inflammatory Bowel Disease. Clinical Gastroenterology*. Humana Press, Totowa, NJ, (23).

Od intestinalnih komplikacija koje se javljaju kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom moguće su pojave:

- perianalne bolesti (hemoroidi, analne fisure, perianalne apscesi), pojava pseudopolipa (uslijed hiperplastične regeneracije sluznice),
- masivnog krvarenja (~1 % bolesnika s teškim oblikom bolesti, ako bolesnik u vremenskom periodu od 24-48 sati primi 6-8 jedinica krvi, indicirana je hitna kolektomija),
- razvoja toksičnog megakolona (akutna dilatacija kolona na više od 6 – 7 cm u promjeru koja se očituje smanjenjem dijareje i/ili krvarenja uz abdominalnu distenziju, tahikardiju, temperaturu  $>38^{\circ}\text{C}$ ; najteža komplikacija bolesti; pojavljuje se u 2 -10% bolesnika, smrtnost iznosi oko 30%),
- perforacija kolona (obično nastaje kao posljedica toksičnog megakolona, praćena je bolovima u truhu, razvojem vrućice, peritonealnim nadražajem i drugim znakovima kliničkog pogoršanja stanja bolesnika, stopa smrtnosti 15 %; nužna hitna operacija bolesnika),
- striktura debelog crijeva (5 do 10 % bolesnika, javljaju se rijetko u uznapredovanoj bolesti, a ako postoji mora pobuditi sumnju na malignu bolest; ako onemogućavaju prolaz kolonoskopom predstavlja indicaciju za kirurški zahvat)
- karcinoma kolona (rizik je neznatan ili ga nema kad je bolesti lokalizirane samo na rektum, a raste s proširenosti bolesti na ljevostrani kolitis te ekstenzivni kolitisa i pankolitisom; rizik 2 % nakon 10 godina, 8 % nakon 20 godina te 18 % nakon 30 godina) (1-3, 9, 17–20).

U 30 do 50 % bolesnika koji su podvrgnuti kirurškom zahvatu proktokolektomije s ileoanalnom anastomozom i formiranjem zdjeličnog rezervoara (engl. *Pouch*) postoji rizik od razvoja upale zdjeličnog rezervoara (engl. *pouchitis*) (1-3, 9, 17–20).

Bolesnici s UC-om obično imaju razdoblja remisije (kompletni nestanak simptoma i endoskopsko mukozno cijeljenje) i relapsa [pojava simptoma (rektalno krvarenje, povećan broj stolica i endoskopski znakovi upale) u etabliranom ulceroznom kolitisu u remisiji bolesti] pa će oko 90% njih iskusiti jedan ili više relapsa nakon inicijalnog nastupa bolesti (1-3, 9, 17–20).

Pri tome relaps može biti rijedak ( $\leq 1$ /godinu), čest ( $\geq 2$ /godinu) ili se može raditi o kontinuirano aktivnoj bolesti. Rani relaps (pojava simptoma u razdoblju  $< 3$  mjeseca nakon postignuća remisije) ili aktivna bolest u prvih 2 godine nakon dijagnoze obično su povezani sa lošijim tijekom bolesti ((1-3, 9, 17–20).

S obzirom da je ulcerozni kolitis dinamična bolest određen jačinom same upale, kao i veličinom zahvaćenog dijela crijeva, osmišljeni su različiti klinički indeksi čiji je cilj odrediti aktivnost odnosno težina same bolesti o kojoj uvelike ovisi terapijski pristup bolesniku (8, 9, 24-26).

Pri tome je u prvom redu potrebno odrediti proširenost bolesti odnosno raširenost upalnog procesa.

Montrealskom konvencijom iz 2005. godine koju je podržalo i Europsko društvo za Crohnovu bolest i kolitis (ECCO, engl. *European Crohn's and Colitis Organization*) ulcerozni kolitis se prema makroskopskom izgledu sluznice (maksimalna raširenost upalnog procesa) tijekom kolonoskopskog pregleda može podijeliti u tri skupine: proktitis (E1), ljevostrani kolitis (E2) i prošireni (ekstenzivni) kolitis (E3) (Tablica 1.5) (8, 9, 24-26). Ovaj troslojni klasifikacijski sustav čini se korisnim u razlikovanju pacijenata po medicinskoj terapiji i prema prognozi (8, 9, 24-26). No s obzirom na činjenicu da je u pedijatrijskoj dobi UC u većini slučajeva karakteriziran proširenim (ekstenzivnim) kolitisom ili pankolitisom, naknadno je prema Pariškom konsenzusu dodana nova, četvrta

skupina za pankolitis (E4; upalni proces se širi od rektuma proksimalno do jetrene fleksure) (tablica 1.5) (8, 9, 24-26).

**Tablica 1.5 Montrealska i Pariška stratifikacija UC pacijenata prema lokaciji upalnog procesa i aktivnost/ozbiljnosti bolesti.**

	MONTREALSKI KONSENZUS	PARIŠKI KONSENZUS
<b>LOKALIZACIJA UPALNOG PROCESA</b> (maksimalna makroskopska ekstenzija bolesti kod kolonoskopije)	<b>E1 ulcerozni proktitis</b> [lokalizacija upale je ograničena na rektum (to jest, proksimalni opseg upale je udaljen od rektosigmoidnog čvora)]	<b>E1 ulcerozni proktitis</b>
	<b>E2 ljevostrani (distalni) kolitis</b> [lokalizacija upalnog procesa distalno od lijenalne fleksure]	<b>E2 ljevostrani (distalni) kolitis</b> [lokalizacija upalnog procesa distalno od lijenalne fleksure]
<b>AKTIVNOST BOLESTI</b> (prema kliničkim kriterijima i procjeni endoskopske aktivnosti)	<b>E3 ekstenzivni kolitis (pankolitis)</b> [bolest proširena proksimalno od lijenalne fleksure uključujući pankolitis]	<b>E3 ekstenzivni kolitis</b> [bolest proširena distalno od jetrene fleksure]
	<b>E4 pankolitis</b> [bolest proširena od rektuma proksimalno od jetrene fleksure]	<b>E4 pankolitis</b> [bolest proširena od rektuma proksimalno od jetrene fleksure]
	<b>S0 Klinička remisija</b> [asimptomatski oblik bolesti]	<b>S0:</b> u povijesti bolesti nije zabilježen teški oblik UC [definiran kao PUCAI (engl. The Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index $\geq 65$ )]
	<b>S1 blaga bolest</b> [ $\leq 4$ stolice dnevno (sa ili bez krvi), odsutnost bilo kakve sistemske bolesti, izostanak groznice, puls manji od 90 otkucaja / min, hemoglobin od 105 g / L ili veći i stopa sedimentacije eritrocita (ESR; engl. erythrocyte sedimentation rate) manja od 30 mm / h]	<b>S1:</b> prisutnost teške bolesti u bilo kojem trenutku povijesti bolesti [definirano kao PUCAI (engl. The Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index $\geq 65$ )]
	<b>S2 umjerena bolest</b> [ $>4$ stolice dnevno (prisutna krv), ali s nepostojećim ili minimalnim znakovima sistemske toksičnosti]	
	<b>S3 teška bolest</b> [ $\geq 6$ krvavih stolica dnevno, brzina pulsa od najmanje 90 otkucaja u minuti, temperatura od najmanje 37,5 ° C, hemoglobin manji od 10,5 g / 100 ml, ESR od najmanje 30 mm / h te CRP (engl. C reactive protein) $>30$ mg/L ]	

Modificirano prema: Silverberg MS, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005; 19 Suppl A: 5A-36A, (8).

Iako je poštuda sluznice rektuma opisana kod  $>3\%$  bolesnika (5–30% pedijatrijskih bolesnik) znatno češće javljaju diskontinuirane (engl. *patchy*) upalne reakcije sluznice rektuma (22, 27-29). Osim toga, kod nekih UC bolesnika može doći i do pojave diskontinuirane upale u području sluznice cekuma (engl. ‘*caecal patch*’) ili distalnog dijela ileuma (22, 30). Ako se upalne promjene šire i u distalni dio ileuma, tada je riječ o tzv. „*backwash ileitis-u*“ koji je dijagnosticiran kod i do 20 % UC bolesnika sa proširenim (ekstenzivnim) kolitisom (pankolitisom) (22, 30).

Stupanj proširenosti upalne reakcije može se i promijeniti nakon inicijalne dijagnoze (8; 31-34). Tako će se prema nekim studijama kod do 50 % pacijenata s inicijalno dijagnosticiranim proktitisom nakon perioda od 10 godina razviti ekstenzivni kolitis, a u skupini pacijenta sa ljevostranim kolitisom taj postotak može biti čak i veći (8, 32, 33, 35-42). No s vremenom može doći i do regresije oboljenja koja po nekim studijama varira od 1.6 % pa sve do 71 % nakon 10 godišnjeg praćenja bolesnika (8, 35-37, 39, 40).

Proširenost bolesti ima posljedice i na aktivnost odnosno težinu bolesti, bilo da se ona mjeri potrošnjom lijekova, brojem hospitalizacija, potrebom za provođenjem kolektomije ili standardiziranim omjerom mortaliteta (SMR, engl. *Standardized mortality ratio* – opažena smrtnost /očekivana smrtnost), a poznat je i njezin kumulativni učinak na pojavnost kolorektalnog karcinoma (8, 35, 42- 57).

Definiranje aktivnosti bolesti je izuzetno važna posebno zato jer o tome uvelike ovisi terapijski pristup pacijentu.

Indeksi za procjenu aktivnosti bolesti mogu se podijeliti na pretežno subjektivne (subjektivna procjena bolesnika ili liječnika: broj pražnjenja stolica, nelagoda ili boli u trbuhu, opće stanja bolesnika ili slično), donekle objektivne (endoskopsko-histološke, biokemijske) ili kombinaciju tih pristupa.

Prema Montrealskoj konvenciji (Tablica 1.5) bolest se može stratificirati na: UC u kliničkoj remisiji (S0; nema simptoma ulceroznog kolitisa); blagi UC (S1; ~ 60% bolesnika); umjereni UC (S2; ~25 % bolesnika) te teški oblik (S3; ~15 % bolesnika) UC-a (8, 32, 35, 58-60). Montrealska klasifikacija bazirana je gotovo u potpunosti na Trueloveovim i Wittsovim kriterijima, ali je modificirana prema sadašnjim kliničkim potrebama kako bi se naglasila razlika između blagog od umjerenog aktivnog kolitisa s obzirom da mogu postojati razlike u djelotvornosti liječenja (58-61).

Pariška modifikacija Montrealske klasifikacije uvela je s obzirom na aktivnost bolesti stratifikaciju na dva stupnja: P0 i P1, gdje se u P0 ubrajaju pacijenti kod kojih nije zabilježen teški oblik UC-a a u P1 pacijenti kod kojih je u povijesti bolesti zabilježen



teški oblik [definirano kao PUCAI (engl. *The Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*  $\geq 65$ )] ulceroznog kolitisa (8, 25, 60, 62).

Indeksi aktivnosti bolesti temeljeni na kliničkim i biokemijskim parametrima (broj stolica na dan, pojava krvi u stolici, temperatura, puls, razina hemoglobina, sedimentacija eritrocita, razina C reaktivnog proteina/CRP itd.) uz već spomenuti indeks aktivnosti prema Truelovu i Wittsu te Montrealsku klasifikaciju aktivnosti bolesti uključuju Powell-Tuckov indeks aktivnosti (*St. Mark's Index*), CAI (engl. *Clinical Activity Index* – Rachmilewitezov indeks), AI (engl. *Activity Index* – Seo indeks), MTWSI (engl. *Modified Truelove and Witts Severity Index*; Lichtigerov indeks) te SCCAI indeks (engl. *Simple Clinical Colitis Activity Index*) (60, 63, 64). Tu možemo ubrojiti i skupinu indeksa u kojima je posebna pozornost posvećena subjektivnim ocjenama kliničara i/ili bolesnika u evaluaciji rezultata liječenja kao što su: PGA (engl. *Physician's Global Assessment*), UCCS (engl. *Ulcerative Colitis Clinical Score*; Feaganov indeks - modificirani Baronov indeks), PDR index (engl. *Patient-defined remission*); globalna evaluacija istražitelja (engl. *Investigators Global Evaluation*) te indeks poboljšanja na temelju individualne procjene simptoma (engl. *Improvement Based On Individual Symptom Scores*) (8, 60, 63, 64). Većina njih se temelji na ocjenjivanju djelotvornosti pojedinih terapijskih protokola, od kojih su samo neki prošli provjeru valjanosti (60, 63, 64).

U literaturi se navode i indeksi aktivnosti bolesti temeljeni samo na procjeni endoskopske aktivnosti (prisutnost hiperemije, edema, gubitka vaskularnog crteža, stupanja granuliranosti, frijabilnosti i krvarenja sluznice, a u uznapredovanoj bolesti nalaza eksudata, erozija, ulkusa, pseudopolipa, striktura ili sl.) kao što su: Truelove-Wittsov i Powell-Tuckov sigmoidoskopski indeks, Baronov indeks, endoskopski indeks (Rachmilewitzov endoskopski indeks), sigmoidoskopski indeks, indeks sigmoidoskopske gradacije upalnog procesa (engl. *Sigmoidoscopic Inflammation Grade Score*), Mayo indeksa procjena fleksibilne sigmoidoskopije (engl. *Mayo Score Flexible Proctosigmoidoscopy Assessment*), Sutherlandov indeks sluznice (*Sutherland Mucosal Appearance Assessment*), UCEIS (engl. *Ulcerative Colitis Index of Severity*), UCCIS (engl. *Ulcerative Colitis Colonoscopic Index of Severity*), EAI (engl. *Endoscopic Activity Index*) i mnogi drugi (60, 63, 64).

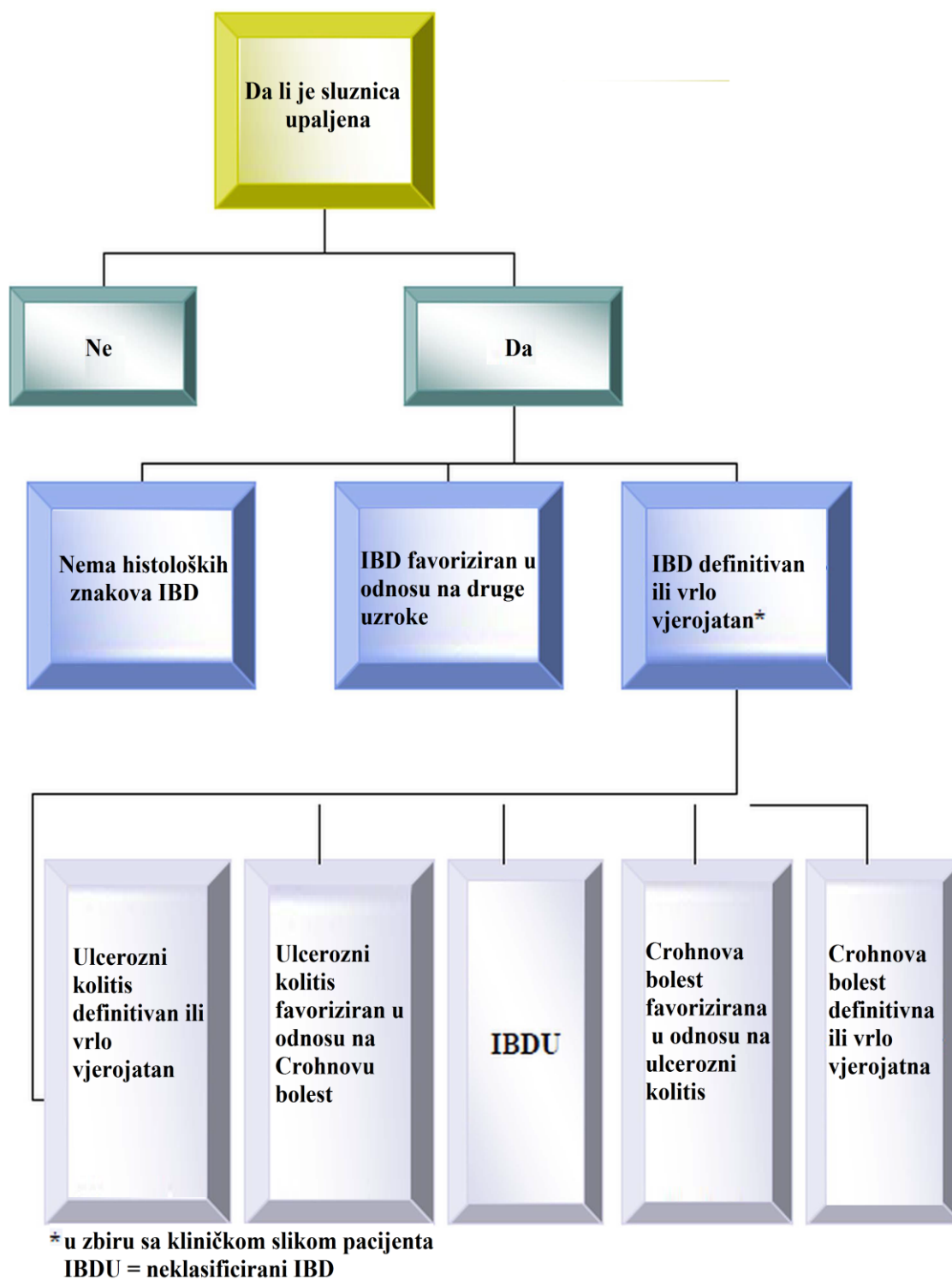
Nekoliko metoda procjene aktivnosti bolesti inkorporiraju kliničke i endoskopske parametre u jedan zajednički indeks aktivnosti poput primjerice Mayo indeksa (engl. *Mayo Clinic Score*, *Disease Activity Index – DAI*) te Sutherlandovog indeksa (*Disease Activity Index –DAI*, *UC Disease Activity Index - UCDAI*) (60, 63, 64). Osim toga prisutne su i metode za procjenu kvalitete življenja UC bolesnika poput primjerice IBDQ (engl. *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*) upitnika za upalne bolesti crijeva (vidi stranicu 46. - Tablica 1.20) (60, 63, 64).

Histopatološka analiza ima također vrlo važnu ulogu u dijagnosticiranju UC-a i može poslužiti kao alat za određivanje reakcije na terapiju. U 2013 godini ECCO i Europsko društvo za patologiju (ESP, engl. *European Society of Pathology*) objavili su konsenzus koji sadrži preporuke za histopatološku (endoskopske biopsije i resekcijski uzorci tkiva) dijagnozu IBD-a (15, 21).

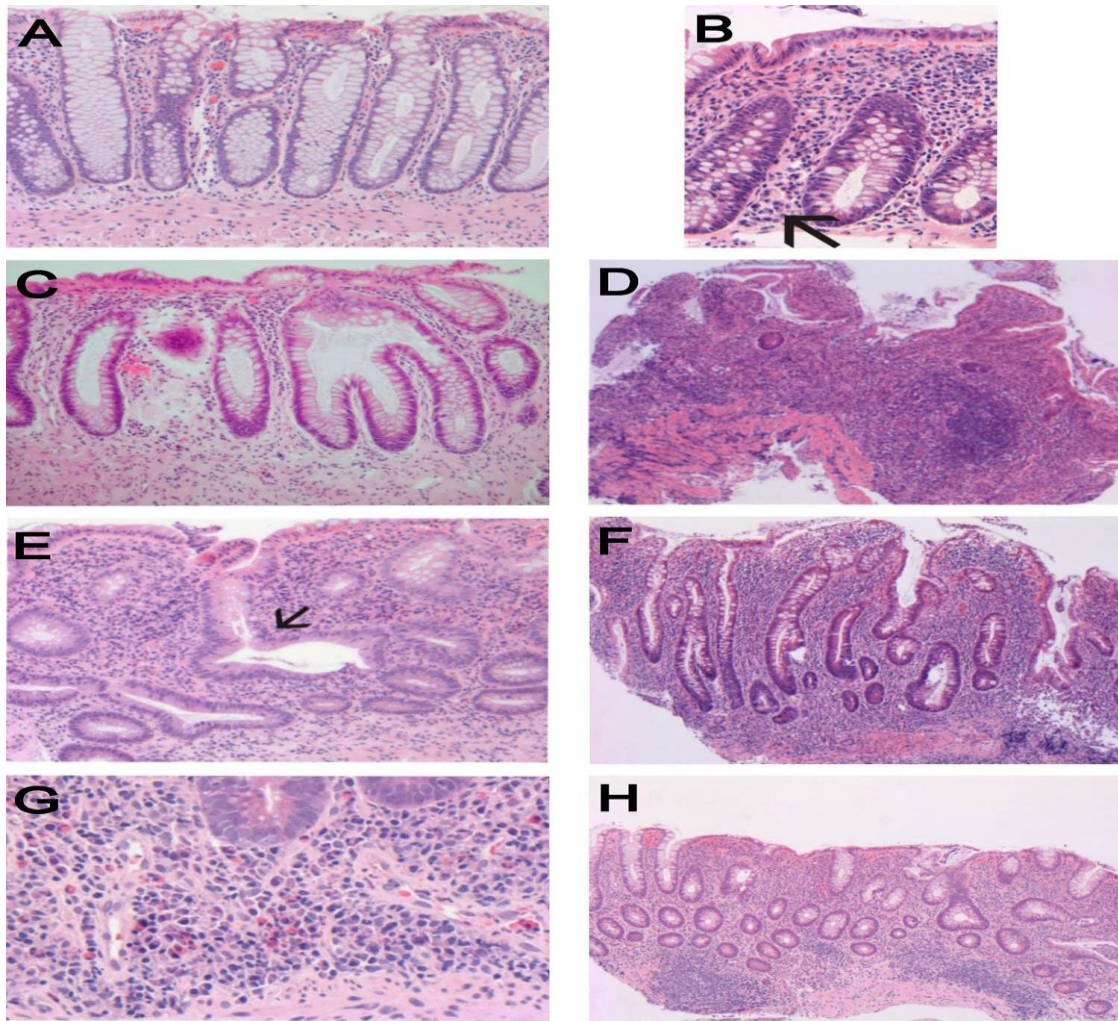
U dostupnoj literaturi navode se višestruki histološki sustavi bodovanja za kvantificiranje mikroinflamacije debelog crijeva koji na kategorički ili numerički način određuju stupanj akutne ili kronične infiltracije upalnih stanica, prisutnosti ili odsutnosti patohistološkog izobličenja kripti kolona te integriteta epitela debelog crijeva i sl. Međutim, od njih 30 opisanih samo ih je 3 prošlo ekstenzivnu validaciju: GS (engl. *Geboes Index*), NI (engl. *Nancy Index*) i RHI (engl. *Robarts Histopathologic Index*) indeks (65).

Preporuka je da se za histološku potvrdu ulceroznog kolitisa [diferencijalna dijagnoza u odnosu na Crohnovu bolest, IBDU te druge moguće razloge za pojavu upalne reakcije unutar gastrointestinalnog sustava (slika 1.6, 1.7 i 1.8; tablica 1.6, 1.7, 1.8 i 1.9)] tijekom inicijalne endoskopske evaluacije uzmu najmanje dva biopsijska uzorka sa pet različitih mjesta debelog crijeva uključujući ileum i rektum (9, 66, 67).

Pri tome se uz uzorke patološki promijenjene (upaljene) sluznice trebaju uzeti i biopsijski uzorci endoskopski normalne sluznice te sve skupa mora biti popraćeno detaljnim opisom kliničke slike i endoskopskog nalaza pacijenta (9, 15, 66, 67).

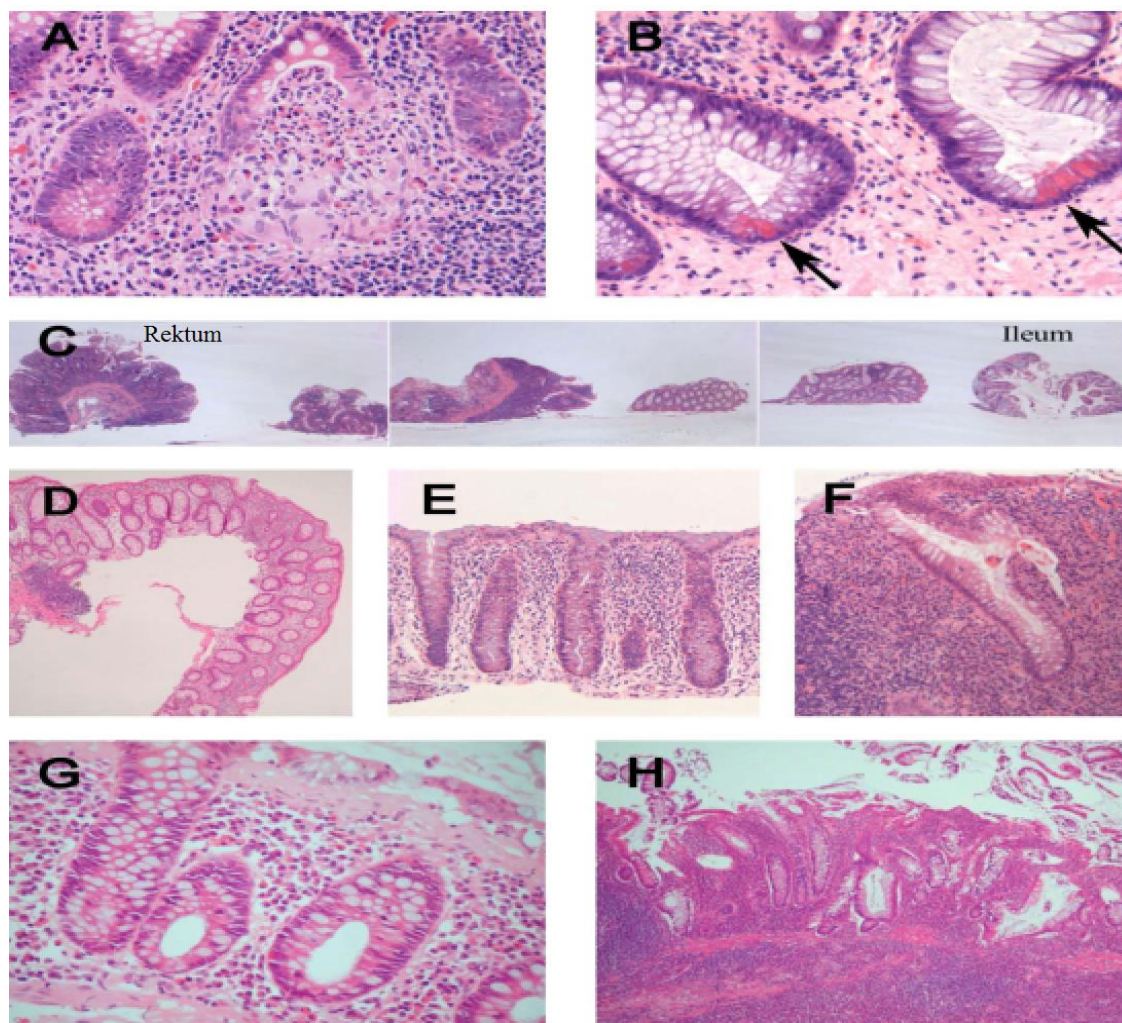


**Slika 1.6 Kategorizacija upalnog procesa u biopsijskim uzorcima IBD pacijenata.** Ovo je pojednostavljeni obrazac - u praksi je čitav proces znatno kompleksniji te uključuje sve prikupljene kliničke i endoskopske parametre. Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol.* 2013; 66(12):1005-26., (67).



**Slika 1.7** (A) Prikaz normalna sluznica kolona sa smanjenjem gustoće plazma stanica od gornje do donje trećine lamine proprije — tzv. ‘gradijent plazma stanica’. Bazalne plazma stanice su odsutne ili su prisutne u malom broju. Vidljiva očuvana arhitektura kripti; kripte su paralelno položene te se pružaju od luminalne površine do muscularis mucosae. (B) U cekumu i ascendentnom kolonu sveukupna gustoća stanica lamine proprije je veća nego drugdje. Bazalne plazma stanice mogu se vidjeti na mjestima obilježenim strelicom te se ne bi nužno trebale interpretirati kao kronična upalna reakcija. (C) Povremeno prisutne razgranate kripte, ukoliko nisu popraćene drugim abnormalnostima sluznice, prihvatljiva su pojava no trebale bi potaknuti na detaljniju potragu za drugim znacima upale (D) Nepravilan, resičast oblik površine sluznice kolona predstavlja abnormalnost te je koristan biljeg IBD-a. Zastupljeniji je kod ulceroznog kolitisa u odnosu na Crohnovu bolest. U prikazanom slučaju ulceroznog kolitisa također je vidljiva razvijena atrofija kripti uz difuznu prisutnost kronične upalne reakcije (E) Distorzija arhitekture crijevnih kripti –uključuje grananje kripti i gubitak paralelnosti. Centralno položena kripta pokazuje “horizontalnu” razgranatost (strelica). (F) Blaga distorzija kripti uključujući “vertikalnu” razgranatost. Dijagnoza IBD-a podupire prisutnost “transmukoznog” kroničnog upalnog infiltrata u lamini propriji uz gubitak gradijenta plazma stanica i prisutnost atrofiranih kripti (blaga atrofija). (G) Bazalna plazmocitoza (prisutnost plazma stanica u bazi mukoze) predstavlja izuzetno koristan biljeg IBD-a kod sumnji u prisutnosti (neprisutnosti) kronične upalne reakcije. Neke od plazma stanica nalaze se ispod skraćenih crijevnih kripti – tzv. “kripte sa stopalima uronjenima u plazma stanice”. I druge upalne stanice su prisutne no plazma stanice je najlakše detektirati. (H) U IBD sluznici mogu se vidjeti bazalni agregati limfoidnih stanica te ih je ponekad teško razlikovati od normalno prisutnih agregata limfoidnih stanica. Preuzeto iz: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol.* 2013;66(12):1005-26., (67).





**Slika 1.8** (A) Kriptolitički granulom nastao uslijed rupture kriptalnog apscesa – kriptolitički granulomi nisu diskriminativni. (B) Metaplazija Panetovih stanica (strelice) sa supranuklearnim eozinofilnim granulama. Prikazan je slučaju dugotrajnog ulceroznog kolitisa. (C) Distribucija upalne reakcije unutar i između različitih dijelova probavne cijevi. Biopat Ileuma (skroz desno) i susjednog naj proksimalnijeg dijela kolona nisu upaljeni dok tri (lijeva strana) biopsije pokazuju znakove kronične infekcije te distorzije i atrofije crijevnih kripti koje se kontinuirano pružaju između različitih mjesta te difuzno unutar svakog bioptata. To u osnovi predstavlja dijagnozu ulceroznog kolitisa (uz pretpostavku postojanja odgovarajuće kliničke slike). (D) Distribucija promjena unutar bioptata: preskačuća (engl. patchy) kronična upalna reakcija kod CD kolitisa. Zamijetite varijabilnost u celularnosti lamine proprije i izrazito fokalnu distorziju crijevnih kripti. (E) Najvjerojatnije prikaz infektivnog kolitisa. Vidljiva je hipercelularnost gornjeg dijela lamine proprije bez bazalne plazmocietoze ili gubitka gradijenta plazma stanica. Kriptitis je neuobičajeno ekstenzivan za infektivni kolitis. (F) Diverzijski proktokolitis sa difuznom upalnom reakcijom i distorzijom crijevnih kripti. Ovaj IBD-u sličan obrazac može se uočiti bez obzira da li je u povijesti bolesti prisutan IBD ali s tendencijom ozbiljnije reakcije kod ulceroznog kolitisa. (G) Kolagen kolitis. Bazalne plazma stanice i gubitak gradijenta plazma stanica može pobuditi sumnju na IBD no korektna dijagnoza indicirana je prisutnošću zadebljale subepitelne kolagenske pruge, degenerativnih promjena epitela i očuvane arhitekture crijevnih kripti. Limfocitni kolitis može predstavljati sličan problem. (H) Divertikularni kolitis sa karakteristikama nalik ulceroznom kolitisu uključujući difuznu kroničnu upalnu reakciju uz prisustvo ekstenzivne distorzije crijevnih kripti. To je relativno čest primjer mimikrije IBD-a u biopsijskoj dijagnostici. Preuzeto iz: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol.* 2013;66(12):1005-26., (67).

**Tablica 1.6 Karakteristike koje favoriziraju IBD vs. akutnog infektivnog kolitisa/akutnog samo-limitirajućeg kolitisa**

<b>Pouzdanost</b>	<b>Karakteristike</b>	<b>Komentar</b>
<b>Vrlo pouzdano</b>	Bazalna plazmacitoza	Najjači prediktor IBD-a Velika konzistentnost između studija Može biti fokalna ili difuzna Bazalne plazma stanice su normalna pojava u cekumu/ascedentnom k olonu
	Distorzija crijevnih kripti / grananje kripti / nenormalna arhitektura kripti Atrofija crijevnih kripti	Velika konzistentnost između studija Donekle prisutna tzv. interobserver varijabilnost <5 kripti po mm jedinstvena karakteristika IBD-a po jednoj studiji Donekle prisutna tzv. interobserver varijabilnost
	Nepravilna/vilozna površina sluznice	Donekle prisutna tzv. interobserver varijabilnost
<b>Donekle pouzdano</b>	Granulomi	Osim kriptolitičkih granuloma validno samo za Crohnovu bolest; infektivni vs ulcerozni kolitis: nije diskriminirajuće
	Bazalne multinukleirane orijaške stanice Bazalni limfoidni agregati	Nisu utvrđene u nekim studijama Mogu se teško razlikovati od normalnih limfoidnih agregata
<b>Manje pouzdano</b>	kronična upalna reakcija u lamini propriji/hipercelularnost	Varijabilne definicije; neke se preklapaju sa gore navedenim preciznijim terminima Mala reproducibilnost
	Metaplazija Panetovih stanica (ako nije drugačije specifičirano/distalno od lijenalne fleksure)	Slaba asocijacija u nekim studijama Korisnost može biti ograničena na dugotrajnu bolest Donekle prisutna tzv. interobserver varijabilnost
<b>Ograničeni podaci</b>	Duboki (radije no površinski) kriptalni apscesi Varijacije u dijametru crijevnih kripti Veliki broj kriptalnih intraepitelnih neutrofila /kriptalni luminalni neutrofili	>10 po kripti ili po lumenu kripti – određuje se analizom 10 kripti

Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol.* 2013; 66(12):1005-26., (67).

**Tablica 1.7 Karakteristike koje favoriziraju infektivni kolitis vs. IBD**

Pouzdanost	Karakteristike
<b>Pouzdanost</b>	Izostanak IBD karakteristika Očuvanje normalne arhitekture crijevnih kripti Nema grananja kripti Paralelne crijevne kripe Odsutnost bazalne plazmacitoze
<b>Manje pouzdano / Ograničeni podaci</b>	Upalna reakcija u gornjoj polovini lamine proprije /povećana celularnost gornje 2/3 sluznice Akutna upalna reakcija (nasuprot kroničnoj/miješanoj upalnoj reakciji) lamine proprije Prisutnost površinskih (nasuprot bazalnih) orijaških multinukleiranih stanica Površinski (nasuprot duboki) kriptalni apscesi Cistični kriptalni apscesi

Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. J Clin Pathol. 2013; 66(12):1005-26., (67).

**Tablica 1.8 Karakteristike koje favoriziraju ulcerozni kolitis vs. Crohnove bolesti**

Pouzdanost	Karakteristike
<b>Pouzdanost</b>	Difuzna abnormalnost kripti unutar i između pojedinih mjesta upalne reakcije Difuzna abnormalnost kripti unutar pojedinih mjesta upalne reakcije Atrofija crijevnih kripti Abnormalna arhitektura crijevnih kripti Vilozna ili nepravilna površina sluznice Deplecija mucina Odsutnost ileitisa
<b>Pouzdanost u nekim studijama uz varijabilnost u definiciji</b>	Difuzna transmukozna kronična upalna reakcija /difuzna upalna reakcija/izraziti difuzna transmukozna infiltracija lamine proprije / transmukozna hipercelularnost lamine proprije
<b>Manje dokaza</b>	Rasprostranjen kriptitis/(engl. „general crypt epithelial polymorphs“) Slijedeće karakteristike učestalije u dostatnijim nego li u proksimalnim dijelovima: difuzna transmukozna upalna reakcija; difuzne promjene crijevnih kripti; fokalne promjene crijevnih kripti

Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. J Clin Pathol. 2013; 66(12):1005-26., (67).

**Tablica 1.9 Karakteristike koje favoriziraju Crohnovu bolest vs. ulceroznog kolitisa**

Pouzdanost	Karakteristike
<b>Pouzdanost</b>	Granulomi (ne-kriptolitički) Fokalna ili preskakajuća (engl. <i>patchy</i> ) kronična upalna reakcija lamine proprije (nasuprot kontinuiranoj/difuznoj) Fokalna ili segmentalna distorzija crijevnih kripti (nasuprot kontinuiranoj/difuznoj) Uključenost ileuma Odsutnost karakteristika ulceroznog kolitisa
<b>Donekle pouzdano</b>	Opadajući proksimalni → distalni gradijent promjena
<b>Ograničeni ili konfliktni podaci</b>	Disproporcionalna upala submukoze Fokalni kriptični apscesi Fokalni kriptitis
<b>Ograničeni podaci iz tzv. ne-inicijalnih studija</b>	Normalna površina sluznice Segmentalna atrofija crijevnih kripti Segmentalna deplecija mucina

Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. J Clin Pathol. 2013; 66(12):1005-26., (67).

### 1.1.2. CROHNOVA BOLEST

Kao što je već spomenuto Crohnova bolest za razliku od ulceroznog kolitisa karakterizirana je diskontinuiranom, transmuralnom (zahvaćena mukoza i submukoza), granulomatoznom, kroničnom upalnom reakcijom koja može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, od usne šupljine do anusa (1-5, 18-20).

S obzirom na distribuciju upalne reakcije CD kod ~ 80% pacijenata zahvaća tanko crijevo i to obično distalni ileum. Pri tome je najčešće zastupljen ileokolitis (~50 % pacijenata – zahvaćen terminalni ileum u kombinaciji sa desnim kolonom) dok je kod ~25% pacijenata prisutan isključivo ileitis.

Nadalje kod ~25% pacijenata bolest je prisutna samo u obliku kolitisa (pretežno upala desnog kolona) (4). Oko 1/3 pacijenata dolazi do zahvaćenosti perianalne regije, a proširenost bolesti na jednjak, želudac ili duodenum je rijetka pojava koja se gotovo uvijek uočava zajedno sa zahvaćenošću distalnijih dijelova tankog ili debelog crijeva (1, 4).

Kao i u slučaju ulceroznog kolitisa precizno određivanje lokalizacije i aktivnosti CD je od temeljne važnosti za predviđanje prognoze te planiranje najprikladnije terapije.

Prvi pokušaji klasifikacije Crohnove bolesti iz 1975. godine (Farmer i suradnici) temeljili su se na anatomske lokalizaciji bolesti kao jednom od glavnih pokazatelja simptomatologije te kliničkog tijeka i prognoze bolesti (terapijski pristup, indikacije za operativni zahvat, rizik od postoperativnog recidiva bolesti, povezanost sa genetskim i serološkim biljezima – npr. anti neutrofilna protutijela) (60, 68). Nešto kasnije Greenstein i suradnici uvidjeli su da se CD, neovisno o svojoj anatomske lokalizaciji, može pojaviti u dva različita klinička oblika odnosno kao relativno agresivni perforirajući (fistula, apsces ili slobodna perforacija; pacijenti brže razvijaju potrebu za reoperacijom) te manje opasni ne perforirajući oblik bolesti (opstrukcija, stalna upalna aktivnost, krvarenje, toksična dilatacija) (60, 69, 70). Interesantno ta dva oblika bolesti povezana su i sa promjenama u mRNA ekspresiji intestinalnog IL-1p i IL1 receptorskog antagonista (71).



Te fenotipske značajke su 1991 ugrađene u prvu međunarodnu klasifikaciju (tzv. Rimski konsenzus) Crohnove bolesti temeljenu na anatomskej distribuciji upalnog procesa (gastroduodenitis, jejunitis, ileitis, kolitis, proktitis, perianalna bolest) te na proširenosti (lokalizirana ili difuzna), potrebi za operacijom (primarni ili rekurentni oblik) i kliničkoj prezentaciji bolesti (primarno upalni, primarno fistulirajući ili primarno stenozirajući oblik bolesti) (60, 72). S obzirom da se Rimaska klasifikacija pokazala nepraktičnom za kliničku uporabu (teoretski je mogla rezultirati sa 756 različitih podgrupa bolesti), 1998 godine na prijedlog Svjetskog kongresa gastroenterologa zamijenjena je tzv. Bečkim konsenzusom (tablica 1.10) prema kojem se u obzir uzimaju dob kod dijagnoze (A; kad je CD po prvi puta dijagnosticiran: radiološki, endoskopski, patološki ili kirurški) lokalizacija (L; maksimalna proširenost upalnog procesa pretraga i tankog i debelog crijeva) i ponašanje bolesti [B; engl. *behavior*; inflamatorna (nepenetrirajuća, nestrikurirajuća), strikturirajuću (konstantno suženje lumena) i penetrirajuću bolest (prisustvo intra-abdominalnih odnosno perianalnih fistula, upalnih nakupina i/ili apscesa)] (73).

**Tablica 1.10 Bečka stratifikacija CD pacijenata prema lokaciji upalnog procesa i aktivnost/ozbiljnosti bolesti.**

KLINIČKI FAKTORI	5 BEČKA KLASIFIKACIJA	
<i>Dob pri dijagnozi (godine)</i>	<i>A1</i>	< 40
	<i>A2</i>	>40
<i>Lokalizacija</i>	<i>L1</i>	<b>Terminalni ileum</b> – donja trećina tankog crijeva
	<i>L2</i>	<b>Kolon</b> – bilo koja lokacija između cekuma i rektuma a bez uključenosti tankog crijeva ili gornjeg GI trakta
	<i>L3</i>	<b>Ileokolon</b> - terminalni ileum sa ili bez uključenosti cekuma te sa bilo kojom lokacijom upalnog procesa između ascendentnog kolona i rektuma
	<i>L4</i>	<b>Gornji GI trakt</b> – bilo koja lokacija upalnog procesa proksimalno od terminalnog ileuma (isključujući usnu šupljinu) bez obzira na moguću uključenost terminalnog ileuma ili kolona
<i>Ponašanje bolesti</i>	<i>B1</i>	<b>nestrikurirajući, nepenetrirajući</b> - upalni proces bez komplikacija tijekom povijesti bolesti
	<i>B2</i>	<b>Strikturirajući</b> - trajno postojanje luminalnog suženja dijagnosticiranog radiološki, endoskopski, kirurški ili patološki sa prestenožnom dilatacijom ili znakovima opstrukcije / bez simptoma penetrirajućeg oblika tijekom povijesti bolesti
	<i>B3</i>	<b>Penetrirajući</b> - prisutnost intraabdominalne ili perianalne fistule, upalnih masa i/ili apscesa u bilo kojem trenutku povijesti bolesti. Perianalne ulceracije su također obuhvaćene a isključuju se postoperativne intraabdominalne komplikacije i perianalne kožne promjene.

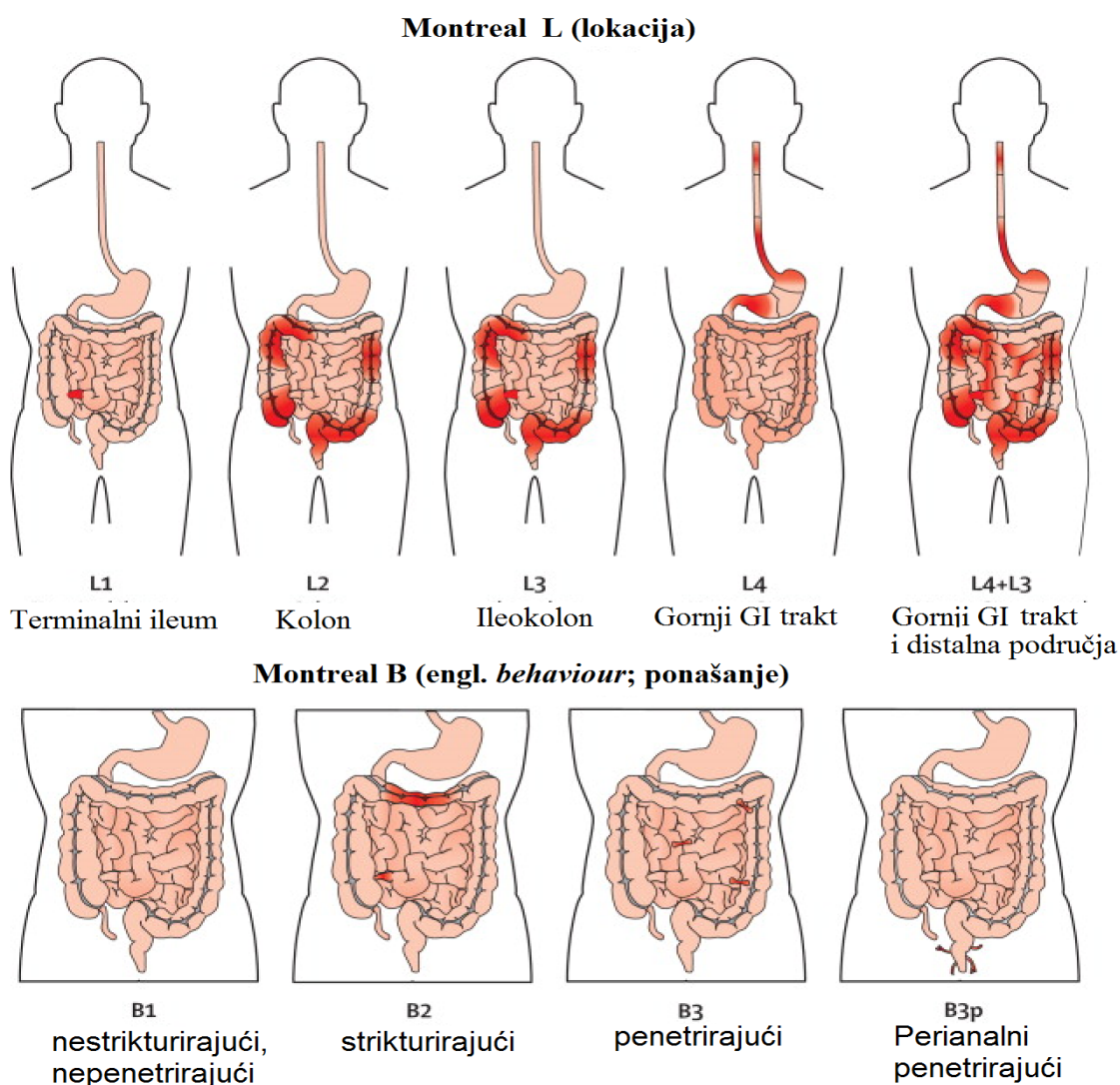
Modificirano prema: Gasche C, et al.. *A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. Inflamm Bowel Dis 2000; 6: 8-15., (73).*

Bečka klasifikacija je 2005 godine zamijenjena Montrealskim konsenzusom (Tablica 1.11, Slika 1.9) koji je nedugo zatim nadopunjen Pariškom klasifikacijom kako bi se obuhvatile temporalne promjene u lokalizaciji i ponašanju bolesti te poremećaji u rastu pedijatrijskih CD pacijenata (24, 25).

**Tablica 1.11 Montrealska i Pariška stratifikacija CD pacijenata prema lokaciji upalnog procesa i aktivnost/ozbiljnosti bolesti.**

KLINIČKI FAKTORI	MONTREAL		PARIZ	
<b>Dob pri dijagnozi (godine)</b>	A1	<17	A1	<10
	A2	17-40	A1b	10-17
	A3	> 40	A2	17-40
			A3	>40
<b>Lokalizacija</b>	L1	Terminalni ileum ± ograničena zahvaćenost cekuma	L1	Distalno 1/3 ileum ± ograničena zahvaćenost cekuma
	L2	Kolon	L2	Kolon
	L3	Ileokolon	L3	Ileokolon
	L4	Gornji GI trakt *	L4a	Gornji GI proksimalno do Treitz ligamenta †
			L4b	Gornji GI distalno na Treitz ligamenta i proksimalno do distalne 1/3 ileuma †
<b>Ponašanje</b>	B1	nestrikturirajući, nepenetrirajući	B1	nestrikturirajući, nepenetrirajući
	B2	strikturirajući	B2	Strikturirajući
	B3	penetrirajući	B3	Penetrirajući
			B2B3	Strikturirajući i penetrirajući
	P	perianalna bolest, modifikator ‡	P	perianalna bolest, modifikator ‡
<b>Rast</b>			G0	Nema naznaka zaostajanja u rastu
			G1	Zaostajanje u rastu

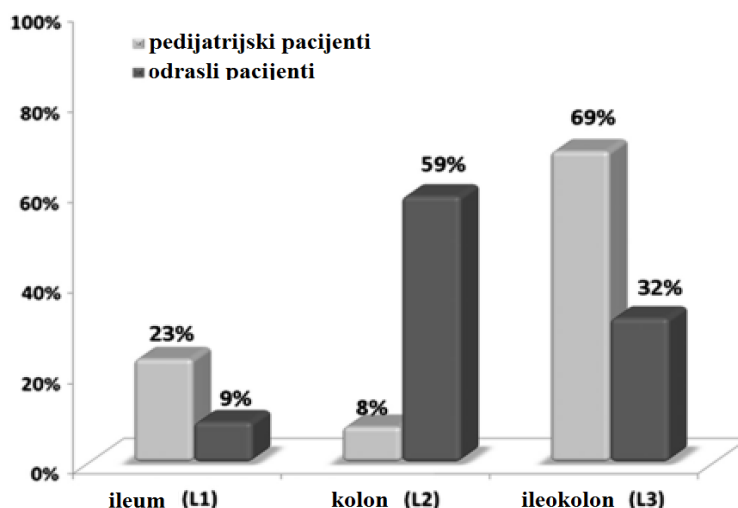
\* U Montrealskoj i Pariškoj klasifikaciji L4 i L4a/L4b mogu postojati zajedno sa L1, L2 ili L3. B2B3 – Strikturirajuća i penetrirajuća bolest: prisutnost B2 i B3 fenotipa kod istog pacijenta, u isto vrijeme ili odvojeno tijekom vremenskog perioda. Penetrirajući fenotip obuhvaća samo intra-abdominalne fistule i apscese, dok su perianalne fistule i perianalni apscesi izdvojeni kao “p” (‡perianal) oznaka, koja se, ako postoji, dodaje fenotipovima B1, B2 i B3. Modificirano prema: Levine A, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:1314-1321. i Laass MW, et al. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev.* 2014; 13(4-5):467-71., (25, 74).



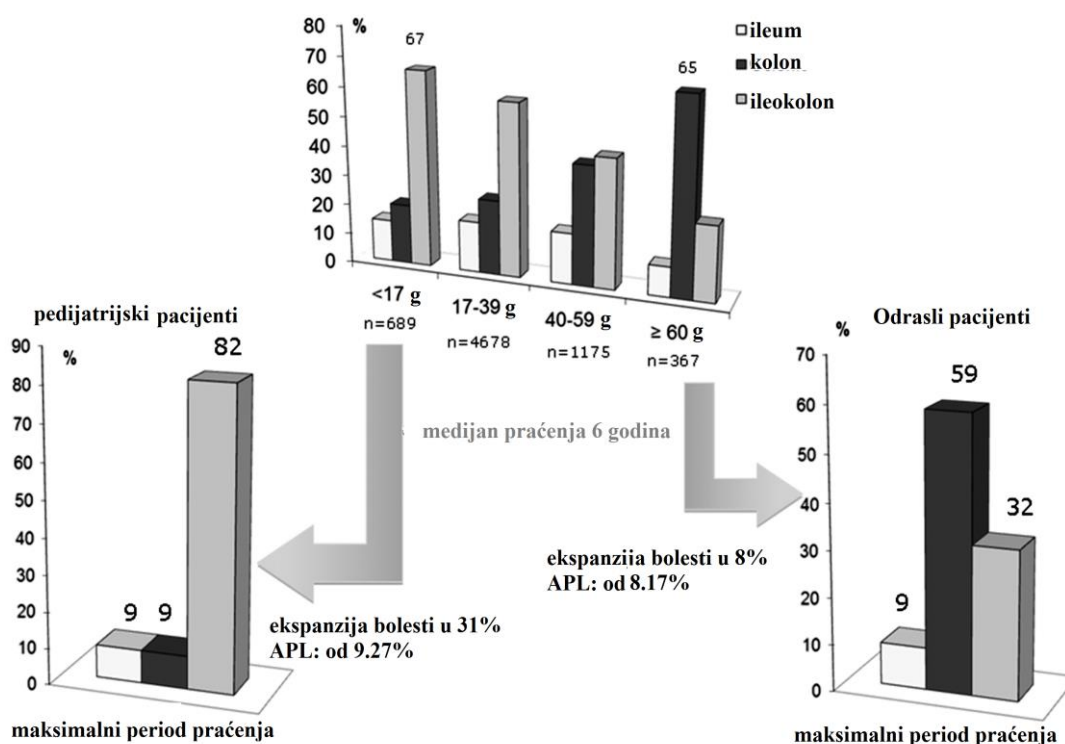
**Slika 1.9 Fenotip Crohnove bolesti s obzirom na lokalizaciju i ponašanje bolesti.** Modificirano prema: Baumgart DC, Sandborn WJ. *Crohn's disease. Lancet.* 2012; 380(9853):1590-605., (75).

Kod odraslih pacijenata lokalizacija bolesti nakon inicijalne dijagnoze najčešće ostaje stabilna tijekom praćenja dok se predominantna fenotipska prezentacija CD kontinuirano mijenja, uz stalan porast broja bolesnika koji iz nestrikturirajućeg i nepenetrirajućeg oblika tijekom vremena razvijaju strikturirajući ili penetrirajući oblik (76).

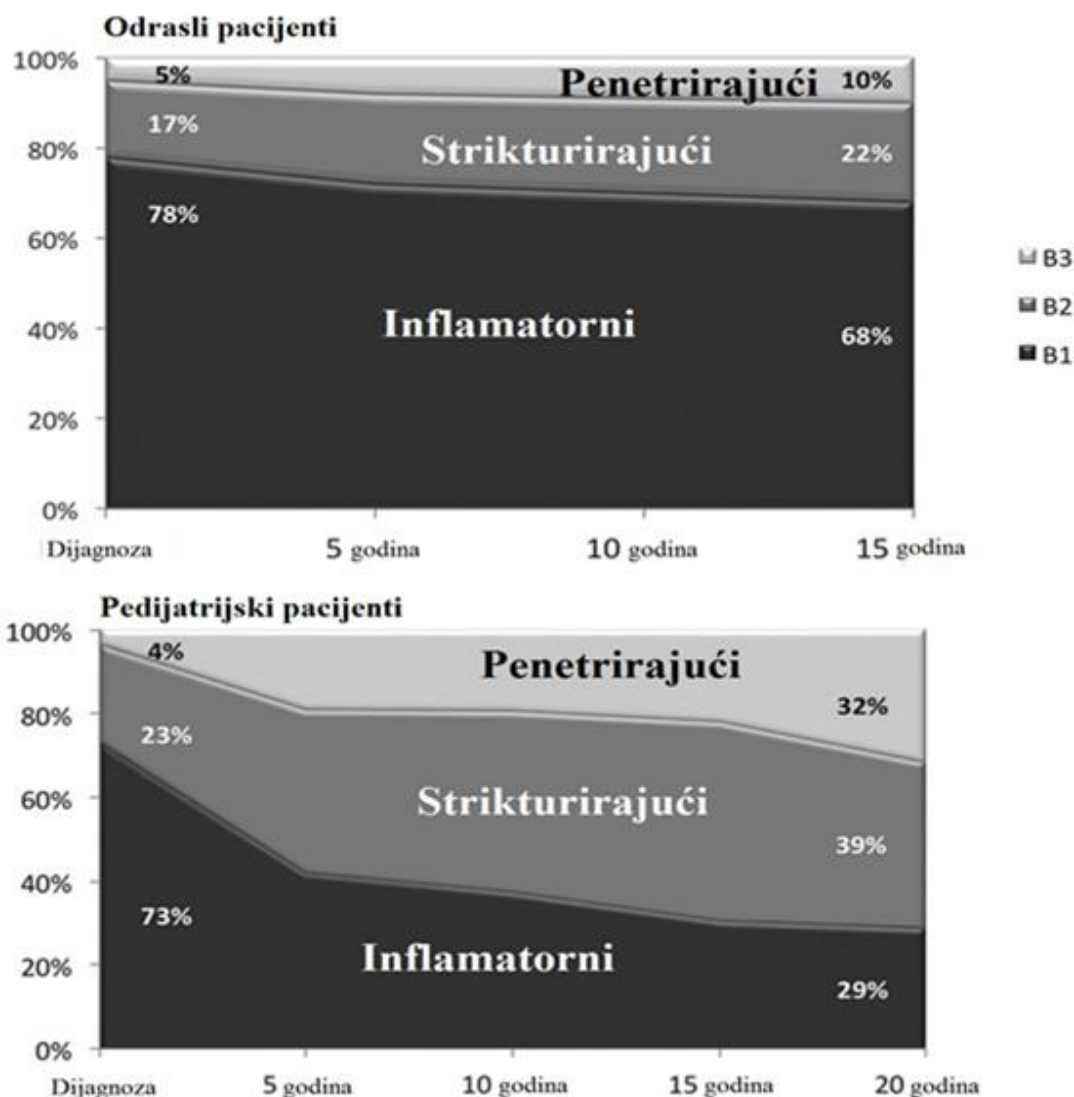
Kod pedijatrijskih pacijenata vidljiva je inicijalna razlika u lokalizaciji upalnog procesa (slika 1.10 i 1.11), a bolest je popraćena i učestalijom ekspanzijom upalnog procesa što u većini slučajeva rezultira većom pojavnosti komplikacija (> 50 % pedijatrijskih bolesnika) s obzirom na ponašanje bolesti (slika 1.12) (77, 78).



**Slika 1.10** Usporedba inicijalne lokalizacije upalnog procesa Crohnove bolesti kod pedijatrijskih i odraslih pacijenata. Modificirano prema: Duricova D, et al. Age-related differences in presentation and course of inflammatory bowel disease: an update on the population-based literature. *J Crohns Colitis*. 2014;8(11):1351-61., (77) i Gower-Rousseau C, et al. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). *Dig Liver Dis*. 2013; 45(2):89-94., (78).



**Slika 1.11** Usporedba lokalizacije upalnog procesa tijekom šestogodišnjeg praćenja pedijatrijskih ( $n = 689$ ) i odraslih CD bolesnika ( $n = 367$ ). Lokalizacija bolesti određena prema modificiranoj Montrealskoj klasifikaciji (ileum + cekum grupirano kao L3). Modificirano prema: Duricova D, et al. Age-related differences in presentation and course of inflammatory bowel disease: an update on the population-based literature. *J Crohns Colitis*. 2014; 8(11):1351-61., (77).



*Slika 1.12 Usporedba evolucije ponašanja CD bolesti između odraslih pacijenata [engl. elderly-onset patients; n = 367] i pedijatrijskih pacijenata [engl. pediatric-onset patients; n = 689]. Ponašanje bolesti grupirano prema Montrealskoj klasifikaciji (inflamatorni = nestrikturirajući, nepenetrirajući). Modificirano prema: Gower-Rousseau C, et al. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). Dig Liver Dis. 2013; 45(2):89-94., (78).*

Makroskopske karakteristike Crohnove bolesti prikazane su u tablici 1.3. Za razliku od ulceroznog kolitisa kod kojeg je upala ograničena na sluznicu specifična značajka Crohnove bolesti je transmuralnost (upalne promjene zahvaćaju cijelu širinu stijenke crijeva) i diskontinuiranost (upalno promijenjeni segmenti odijeljeni područjima normalne sluznice - tzv. preskačuće lezije; eng. "skip lesions", sa oštrim prijelazima iz zahvaćenog u nezahvaćeni dio crijeva) upalnog procesa (15).

U najranijoj fazi promjene su lokalizirane samo na sluznici na kojoj se vide točkasta krvarenja dok aftozni ulkusi (površinske erozije sluznice, promjera 1-2 mm s hemoragičnim rubovima i žućkasto-bjelkastom bazom, koje se tipično nastaju kao rezultat ekspanzije limfoidnih folikula) okruženi sluznicom normalnog izgleda predstavljaju najraniju makroskopsku manifestaciju bolesti (15).

Upaljena sluznica ima hiperemičan izgled te može biti pokrivena seroznim upalnim eksudatom, dok kod dugotrajne bolesti dolazi do pojave seroznih adhezija.

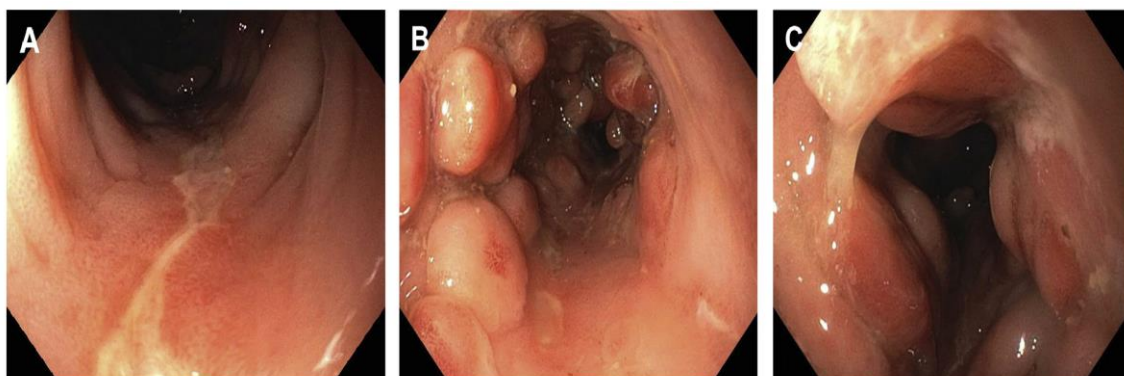
Transmuralnim širenjem upalnog procesa seroza postaje crvena, zamućena i granulirana, a masno tkivo iz mezenterija (edematozan, zadebljan, skraćen i ponekad fibrozno uz prisustvo povećanih limfnih čvorovima koji su mekani, ali bez kazeozne nekroze) se navlači preko seroze crijeva tako da ono izgleda kao da je djelomično omotano masnim tkivom (engl. *fat wrapping*).

Zadebljanje mezenterija (uočeno uglavnom u tankom crijevu te rjeđe u debelom crijevu) predstavlja jednu od dijagnostičkih karakteristika CD-a no može se, zajedno s ostalim karakteristikama CD kolitisa (ulcerozna puknuća -engl. *Fissuring ulcers*, granulomi, transmuralni limfoidni agregati) javiti i kod segmentalnog kolitisa povezanog sa divertikulozom (SCAD; engl. *Segmental colitis associated with diverticulosis*) (15).

Napredovanjem bolesti dolazi do stapanja aftoznih ulkusa i nastanka dubokih serpentinastih, uzdužnih i poprečnih ulceracija okruženih edematoznom sluznicom što luminalnoj površini crijeva daje karakterističan kaldrmast izgled raspucane zemlje (engl. *Cobblestone*) (slika 1.13 i 1.14).

Produbljivanjem ulkusa mogu nastati različite intestinalne komplikacije CD-a: fibrostenotičke ili upalne strikture (suženje crijeva na mjestima transmuralne upale sa fibrozom i fibromuskularnom proliferacijom; češće u tankom nego li u debelom crijevu), fistule (nenormalni kanali koji se spajaju) i intra-abdominalni apscesi (gnojem ispunjeni džepovi infekcije) dok slobodna perforacija unutar trbušne šupljine predstavlja rijetku pojavu (slika 1.15 i 1.16).





**Slika 1.13** Kolonoskopski prikaz Crohnove bolesti sa zahvaćenim ileokolonom (A) linearne ulceracije (B, C) kaldrmast izgled sluznice sa pridruženom strikturom descendnog kolona. Preuzeto iz: Al-Bawardy B, et al. *Endoscopic and Radiographic Assessment of Crohn's Disease. Gastroenterol Clin North Am.* 2017; 46(3):493-513., (79).

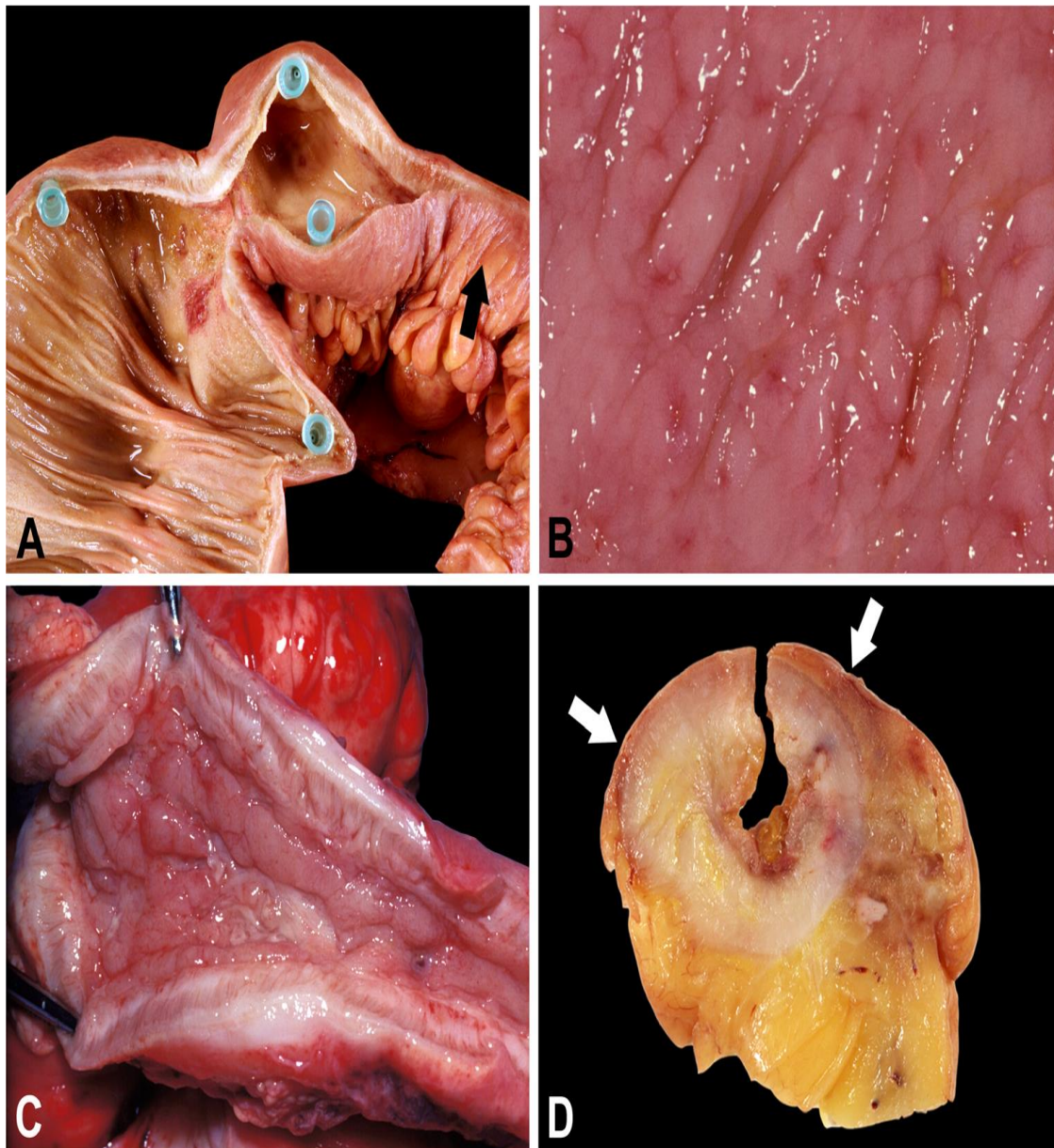
Kao i kod ulceroznog kolitisa moguća je i pojava upalnih polipa i pseudopolipa (preostala područja sluznice razasuta između ulceroznih površina) (slika 1.13).

Fistule se često detektiraju u tankom crijevu ali se također mogu pojaviti i u kolonu i to uglavnom kod pacijenata sa ileokolitisom.

Fistule mogu biti enteroenteralne (između vijuga crijeva); enterokutane (šire se između crijeva i kože) te rektovaginalne odnosno enterovezikalne (očituje se pneumaturijom-pojavom zračnih mjehurića u mokraći) koje prodiru u susjedne organe koji se nalaze uz crijevo ili se prezentiraju kao perianalna bolest s otvaranjem fistuloznih kanala glutealno ili na koži perianalne regije.

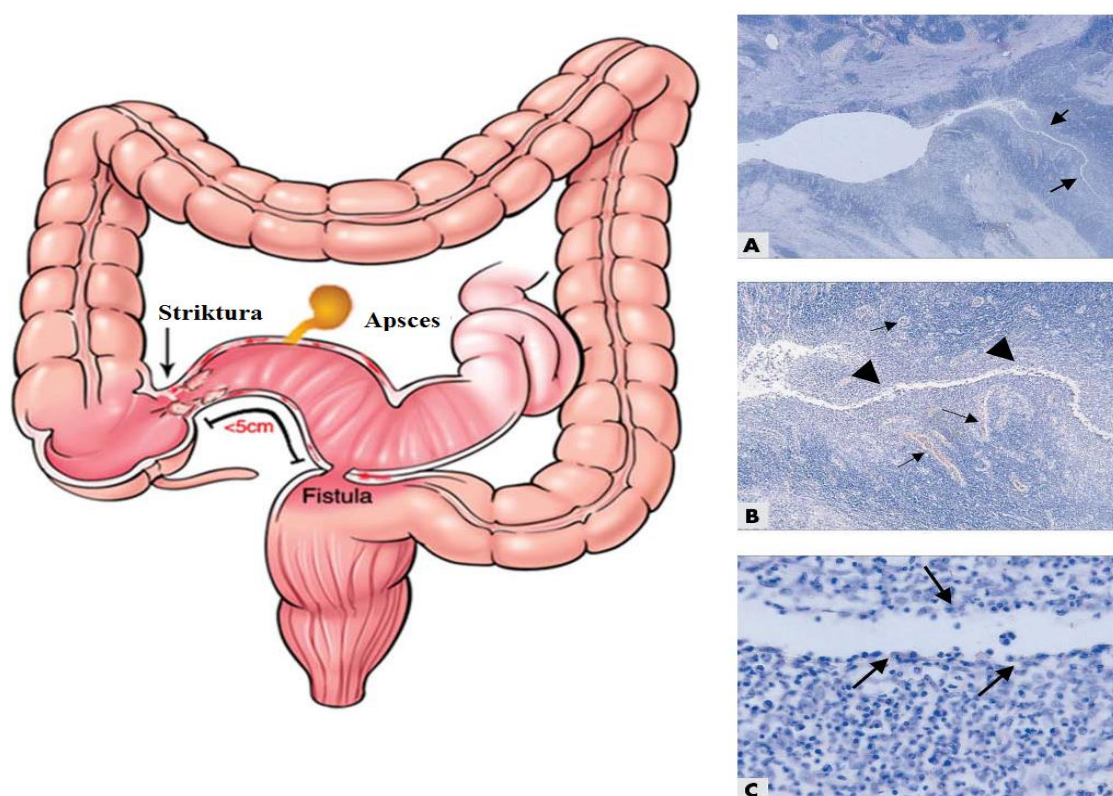
Perianalne patološke promjene (~75% pacijenata sa CD u području debelog crijeva) mogu prethoditi intestinalnim manifestacijama oboljenja (15). Perianalne fistule i apscesi javljaju se u 1/4 do 1/3 slučajeva, neovisno o aktivnosti intraabdominalne bolesti te često predstavljaju najveće poteškoće Crohnove bolesti.

Transmuralnost upalne reakcije koja dovodi do suženja, zadebljanja i povećanja rigidnosti crijeva te fistuliranja kroz stijenku crijeva odgovorna je i za karakteristične grčevite boli u truhu bolesnika s Crohnovom bolesti i pojavu intraabdominalnih upalnih nakupina.

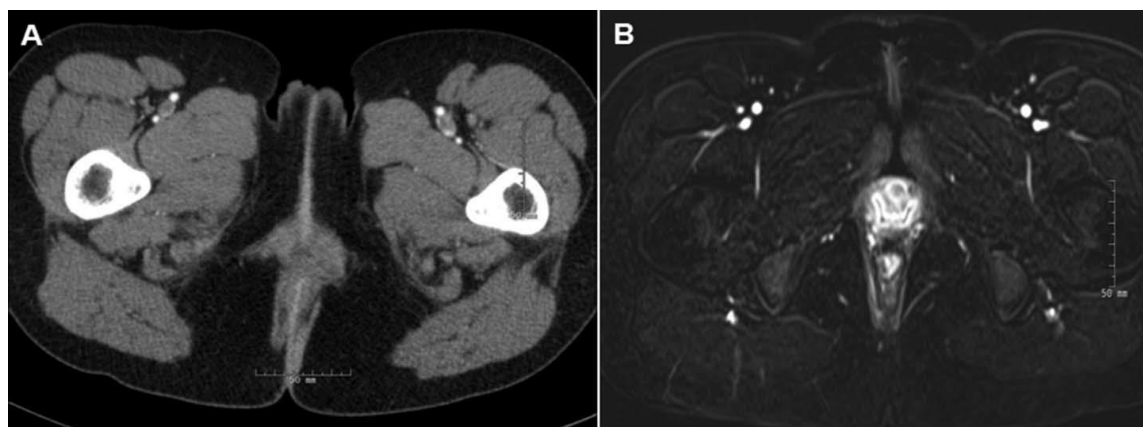


**Slika 1.14** (A) Resekcijski uzorak tkiva CD pacijenta sa klasičnim diskontinuiranim obrascem upalne reakcije (engl. skip lesions). Adipozno tkivo koje se pruža prema antimezenteričnoj površini može se opaziti uglavnom u tankom crijevu ('fat wrapping', strelice). (B) Mali aftozni ulkusi koji se razvijaju iz limfoidnih folikula predstavljaju najranije makroskopski vidljive lezije kod CD-a. (C) Rastom aftoznih ulkusa dolazi do njihovog stapanja i nastanka dubokih uzdužnih i poprečnih ulceracija obrubljenih edematoznom sluznicom. (D) Na mjestima transmuralne upalne reakcije sa fibroznom i fibromuskularnom proliferacijom može doći do zadebljanja crijevne stijenke i pojave striktura. (D) Kao sekundarni nalaz vidljiva su zadebljanje mezenterija (engl. fat wrapping; strelice). Preuzeto iz: Langner C, et al. *The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide*. *Virchows Arch*. 2014; 464(5):511-27., (22).





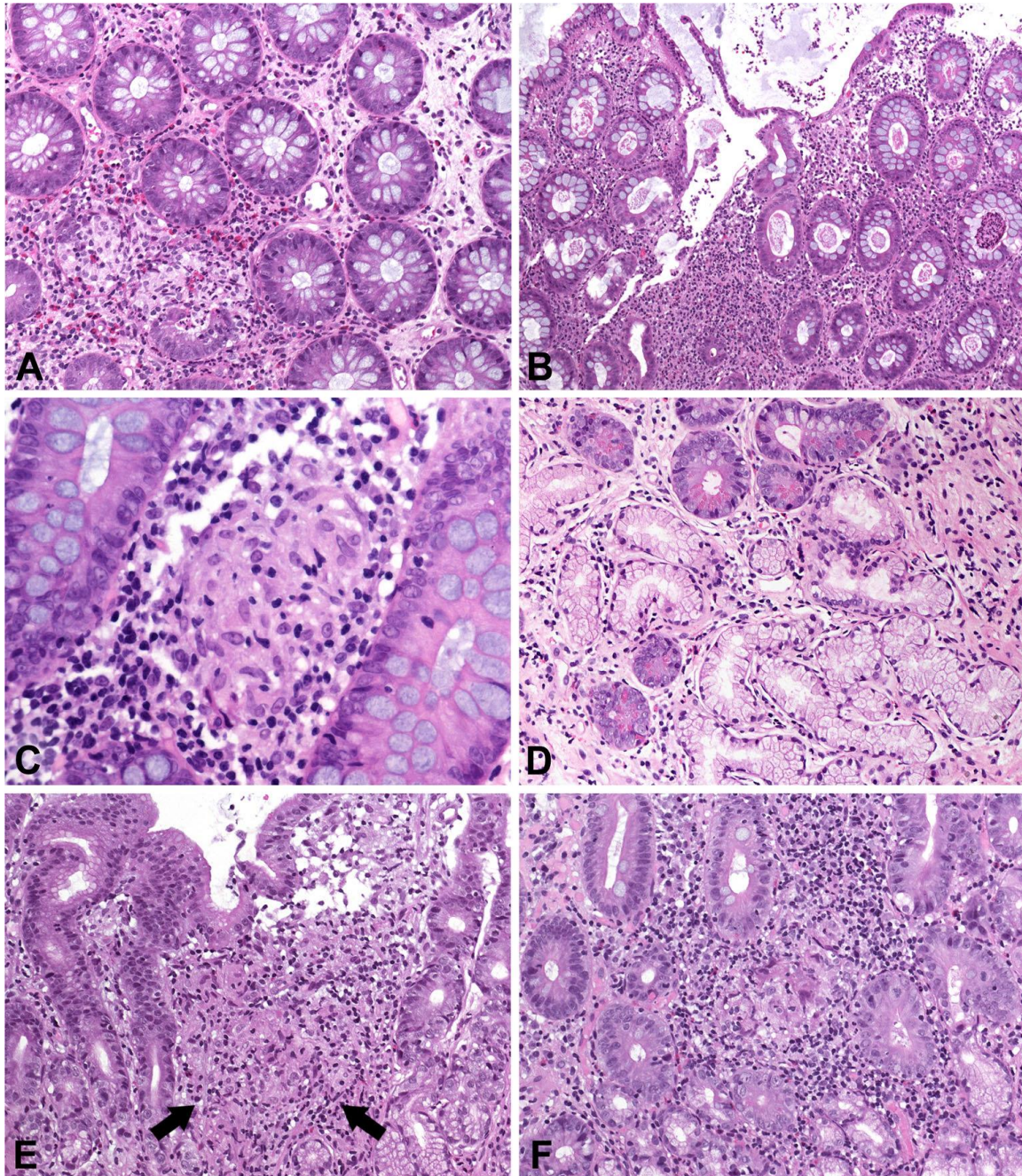
**Slika 1.15.** Lijevo - shematski prikaz striktura, fistula i intra abdominalnih apscesa kod Crohnove bolesti debelog crijeva. Desno - histološki prikaz fistula u kolonu CD pacijenta. (A) prikaz fistule pri malom povećanju (16 X) H&E bojanje. Mukoza je uništena, ulcerirana i zamijenjena granulomatoznim tkivom, uključujući i gustu kapilarnu mrežu. Površina je prekrivena fibrinom i neutrofilima. U desnom dijelu vidi se duboka fistula koja infiltrira u muskularis proprije (strelice). (B) (H&E bojanje, povećanje 50X) Centralna fisura (glave strelica) razgranata je duboko u priležuce tkivo, obložena neutrofilima, granulacijskim tkivom sa brojnim kapilarama (strelice), histocitima i limfocitima. (C) (H&E bojanje, povećanje 400X) Na površini centralne fisure nalazi se tanki sloj histiocita i neutrofila (strelice). Epitel se ne detektira. Preuzeto iz: Chen M, Shen B. Endoscopic Therapy in Crohn's Disease: Principle, Preparation, and Technique. Inflamm Bowel Dis. 2015; 21(9):2222-40. (80) i Bataille F, et al. Morphological characterization of Crohn's disease fistulae. Gut. 2004; 53(9): 1314-1321, (81).



**Slika 1.16 (A) CT i (B) MRI prikaz fistula kod pacijenta sa Crohnovom bolesti.** Vidljiv bolji prikaz fistule uporabom magnetske rezonance. Preuzeto iz: Chen M, Shen B. Endoscopic Therapy in Crohn's Disease: Principle, Preparation, and Technique. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(9):2222-40., (80).



Mikroskopske karakteristike Crohnove bolesti prikazane su u tablici 1.4. i slici 1.15 (15, 22).



**Slika 1.15** Histološki prikaz mikroskopskih promjena kod Crohnove bolesti, (A; povećanje 150 X) Fokalna (diskontinuirana) upala sluznice u CD kolitisu sa ulceracijama (B; povećanje 100 X) i slabo definiranim epiteloidnim staničnim granulama koje nisu povezane sa lezijama crijevnih kripti (C; povećanje 400 X). (D; povećanje 150X) Metaplazija piloričnih žlijezda. (E; strelice; povećanje 100 X) Uključenost gornjeg GI trakta sa fokalnim gastritisom i duodenitisom (F, povećanje 100 X). Preuzeto iz: Langner C, et al. *The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide.* *Virchows Arch.* 2014; 464(5):511-27., (22).

Fokalna (diskontinuirana) kronična upalna reakcija, fokalna (diskontinuirana) distorzija crijevnih kripti i nakupljanje granuloma (ne-kriptolitički; koji nisu povezani sa lezijama kripti) u zahvaćenoj sluznici crijeva predstavljaju općenito prihvaćene mikroskopske karakteristike koje dozvoljavaju dijagnosticiranje Crohnove bolesti (endoskopska biopsija) unutar kolona, a iste mikroskopske karakteristike uz nepravilnu viloznu strukturu sluznice idu i u prilog dijagnosticiranja Crohnove bolesti u endoskopskom bioptatu ileuma (15, 22). No kod bolesnika kod kojih je ileitis dijagnosticiran u kontinuitetu sa kolitisom, dijagnostičke vrijednosti navedenih nalaza moraju se uzeti s oprezom jer se isti također mogu javiti i u slučaju tzv. “backwash ileitis-a” kod ulceroznog kolitisa (15, 22).

Pod fokalnom (diskontinuiranom) upalnom reakcijom u prvom redu podrazumijevamo povećanje celularnosti (limfocit, plazma stanice) lamine proprije koje se različitim intenzitetom provlači uzduž tkiva endoskopskog bioptata i nije ograničeno na površinski sloj sluznice (15, 22). Pri tome se prisutnost normalnih limfoidnih agregata ne ubraja u fokalnu upalnu reakciju (15, 22).

Napredovanjem upale neutrofili infiltriraju epitel crijevnih kripti (kriptitis) i razaraju ga stvarajući kriptalne apscese (prisutnost neutrofila u lumenu kripti) te uzrokuju destrukciju kripti što zajedno uzevši, kao i u slučaju ulceroznog kolitisa, indicira prisutnost aktivne bolesti i oštećenje endotela (15, 22). Navedena fokalna žarišta upalne reakcije mogu se javiti u pozadini normalne crijevne sluznice ili u bioptatu sa različitim intenzitetom upale (15, 22). Nakupljanjem upalnih stanica nastaju granulomi [čvorčići definirani kao nakupina aktiviranih epiteloidnih histiocita (monociti/makrofazi: vidljivi kao klasteri velikih stanica sa ovalnom jezgrom i izraženom blijedo-eozinofilnom citoplazmom nalikuju epitelnim stanicama –otuda naziv epiteloidni histiociti)] bez kazeozne nekroze te uz ili bez prisustva multinukleiranih orijaških stanica (15, 22). Oni se mogu pojaviti u bilo kojem sloju crijevne stijenke (od mukoze do seroze; najčešći u submukozi) kao i u nezahvaćenom dijelu crijeva od usta do anusa (jednako česti u gornjem GI traktu kao i u ileumu i kolonu) te u mezenteričnim limfnim čvorovima (15, 22). No kako su u prosjeku prisutni u ne više od 50-60% slučajeva (u resekcijskom materijalu - 15-82%; u bioptatu - 3-56%) njihova odsutnost ne isključuje dijagnozu Crohnove bolesti.

Granulomi su inače češći kod djece (82% resekcijskog materijala) i adolescenata nego li kod odraslih pacijenata (15, 22). Naime učestalost granuloma je dvostruko veća kod pedijatrijskih bolesnika no nakon druge godine trajanja bolesti te nakon 16 godine starosti pacijenta dolazi do njihove redukcije (15, 22). Nadalje, samo granulomi koji nisu povezani sa lezijama crijevnih kripti mogu se uzeti u obzir pri dijagnozi Crohnove bolesti (15, 22). Naime granulomi bez kazeozne nekroze, male nakupine epiteloidnih histiocita sa orijaškim stanicama ili izolirane orijaške stanice javljaju se i kod infektivnog kolitisa (akutni samo-limitirajući kolitis), parazitne infestacije i crijevne tuberkuloze (15, 22). Tako se primjerice granulomi mogu javiti kod infekcije sa *Mycobacterium sp.*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Treponema sp.*, dok su mikro granulomi mogući kod infekcije sa *Salmonella sp.* *Campylobacter sp.* te *Yersinia enterocolitica*, a orijaške stanice kod infekcije sa *Chlamydia sp.* (15, 22). Osim ne- kriptolitičkih granuloma, kod Crohnove bolesti cijelom debljinom stijenke (obično izvan ulkusnih područja) nalaze se i transmuralni limfoidni agregati (15, 22).

Metaplazija mukoznih žlijezda, nastala kao posljedica ulceracije i zacjeljivanja sluznice, znatno češće se opaža kod Crohnove bolesti u odnosu na ulcerozni kolitis. Tako primjerice metaplazija piloričnih žlijezda (pseudopiloričnih žlijezda), koja se detektira u 2-27% biopsija ileuma, predstavlja vrlo čest nalaz u resekciji ileuma CD pacijenata (15, 22). Ona se doduše vrlo rijetko detektira i u resekcijskom materijalu ileuma kod ulceroznog kolitisa sa tzv. *backwash ileitis*-om i to samo u kombinaciji sa aktivnim ileitisom sa ili bez ulceracija ali ne i u biopstatima ileuma UC pacijenata (15, 22). Pri duljem trajanju bolesti sluznica atrofira, a resice u tankom crijevu se skraćuju i proširuju (15, 22). Naime, fokalna, diskontinuirana kronična upalna reakcija dovodi do promjena u arhitekturi sluznice i submukoze [fokalna iregularnost crijevnih kripti, submukozna fibroza, distalna metaplazija Panethovih stanica, neuralna (hiperplazija nervnih vlakana) i muskuarna hipertrofija, dilatacija limfnih kanala], no one su manje izražene nego li u slučaju ulceroznog kolitisa (15, 22).

Neke od karakteristika korisnih pri dijagnosticiranju Crohnove bolesti u odnosu na ulcerozni kolitis i infektivne upalne reakcije GI trakta prikazane su u tablici 1.12 (67).



**Tablica 1.12 Neke od karakteristika korisnih u dijagnozi i klasifikaciji IBD-a**

Karakteristike	IBD>infektivna	Infektivna >IBD	UC>CD	CD>UC
<b>Arhitektura</b>				
Očuvana arhitektura		+++		+
Distorzija kripti	+++		++	
Atrofija kripti	+++		++	
Difuzne (unutar i između lokacija) promjene kripti (IBD)			+++	
Ne-difuzne promjene kripti (IBD)				+
Iregularna površina sluznice	+++		++	
<b>Upalna reakcija</b>				
Bazalna plazmacitoza	+++			
Limfoidni agregati	++			
Difuzna (unutar i između lokacija) CI (in IBD)			+++	
Ne-difuzna/fokalna kronična (IBD)				++
Upalna gornje LP		+		
Granulomi (ne-kriptolitički)	++			++++
LP akutna upala (ne CI)		+		
Rasprostranjeni kriptitis (IBD)			+	
<b>Druge promjene</b>				
Deplecija mucina			++	
Metaplazija Panetovih stanica	+			
Ileitis (IBD)				++

++++ vrlo izrazito diskriminirajuće; +++ izrazito diskriminirajuće; ++ umjereno diskriminirajuće; + slabo diskriminirajuće; CD: Crohnova bolest; CI: kronična upala; IBD, upalne bolesti crijeva; LP: lamina proprija; UC: ulcerozni kolitis. Modificirano prema: Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol.* 2013; 66(12):1005-26., (67).

Klinička slika Crohnove bolesti razlikuje se od bolesnika do bolesnika (pa i u istog bolesnika ovisno o stadiju bolesti) i ovisi o anatomskom dijelu crijeva zahvaćenog upalom, proširenosti i aktivnosti/intenzitetu bolesti kao i o prisutnosti specifičnih komplikacija (stenoze, fistule i apscesi itd) koje se pojavljuju kao posljedica kroničnog, dugotrajnog trajanja bolesti (tablica 1.13). Glavni simptomi Crohnove bolesti su grčevi, bol u trbuhu, dijareja, vrućica, umor, mučnina, gastrointestinalno krvarenje i gubitak tjelesne težine (Tablica 1.1) (2, 4, 82).

**Tablica 1.13 Glavni simptomi Crohnove bolesti ovisi o anatomskom dijelu crijeva zahvaćenog upalom**

Lokacija	Simptomi	Komentar	Učestalost*(%)	Uobičajena dijagnostička metoda
<b>Ileum i kolon</b>	Dijareja, grčevi, bol u truhu, gubitak na težini	Najučestaliji oblik	35 %	Kolonoskopija sa ileoskopijom, CT enterografija, biopsija
<b>Kolon</b>	Dijareja, rektalno krvarenje, perirektalni apscesi, fistule, perirektalne ulceracije	Učestalije kožne lezije i artralgije	32 %	Kolonoskopija sa ileoskopijom, CT enterografija, biopsija
<b>Ileum</b>	Dijareja, grčevi, bol u truhu, gubitak na težini	Komplikacije mogu uključivati formiranje fistula ili apscesa	28 %	Kolonoskopija sa ileoskopijom, CT enterografija, endoskopija kapsulom, praćenje protoka kroz tanko crijevo, enteroskopija, biopsija, MR enterografija
<b>Gastroduodenum</b>	Anoreksija, gubitak težine, mučnina, povraćanje	Rijedak oblik. Može doći do opstrukcije crijeva	5 %	Ezofagogastroduodenoskopija, praćenje protoka kroz tanko crijevo, enteroskopija

CT = kompjuterizirana tomografija; MR = magnetska rezonancija

\* Učestalost Crohnove bolesti s obzirom na lokaciju razlikuje se s obzirom na različite studije (vidi str.23, referenca no. 4). Modificirano prema: Wilkins T, et al. *Diagnosis and management of Crohn's disease. Am Fam Physician. 2011; 84(12):1365-75., (82).*

Kronični ili povremeni proljev zbog smanjene apsorpcije i povećane sekrecije elektrolita u upaljenim segmentima crijeva javlja se u ~ 90% oboljelih te predstavlja najučestaliji simptom aktivne bolesti. Do dijareje može doći i uslijed tzv. prekomjernog rasta mikroorganizama u tankom crijevu (SBB0; engl. *Small bowel bacterial overgrowth*; uglavnom kod opstruktivne bolesti) ili uslijed smanjene apsorpcije žučnih kiselina u terminalnom ileumu što može dovesti i do nastanka steatoreje (2, 4, 82).

Bol se javlja kao početni simptom u 60-70% bolesnika, često nakon uzimanja hrane a smiruje se nakon defekacije. Umjerene je jačine a može biti stalna ili u obliku kolika te je često lokalizirana je u središnjem i donjem dijelu trbuha. Smatra se da je posljedica kroničnog suženja crijeva upalnim procesom (najčešće ileuma) te može oponašati kliničku sliku akutnog apendicitisa (2, 4, 82). Proljevaste stolice obično su bez primjesa krvi, a ako rektum nije zahvaćen bolešću nisu praćene tenezmima. Krvarenje je manje izraženo (40%) u odnosu na ulcerozni kolitis (83-95%) (2, 4, 82). Može biti u rasponu od okultnog do teškog krvarenja. Pojavljuje se u polovici bolesnika s kolitisom te u manje od četvrtine bolesnika s ileokolitisom, dok je masivno krvarenje vrlo rijetko: ~ 0,9 - 6 % pacijenata (2, 4, 82).

Povišena tjelesna temperatura niskog intenziteta je često prisutna kao odraz upalnog procesa dok vrućica povećanog intenziteta može nastati kao rezultat intra-abdominalnih apscesa i sekundarne infekcije u penetrantnom obliku bolesti (2, 4, 82). Gubitak tjelesne težine najčešće posljedica anoreksije i proljeva, a rjeđe prave malapsorpcije (2, 4, 82). Zastoj u rastu predstavlja čestu komplikaciju kod pedijatrijskih bolesnika (~30% kod inicijalne dijagnoze) a u sveukupnoj skupini njime je pri inicijalnoj prezentaciji obuhvaćeno 7-56% bolesnika (u odnosu na 0-10% bolesnika sa ulceroznim kolitisom) (2, 4, 82). Kao što je već spomenuto, bolest obilježavaju periodi aktivne bolesti koji se izmjenjuju s asimptomatskim razdobljima u trajanju od nekoliko tjedana ili mjeseci. Prema nekim podacima oko 1/2 bolesnika nalazi se u remisiji bolesti (2). Unutar prvih 8 godina od inicijalne dijagnoze otprilike 13% bolesnika imat će tijekom bolesti bez simptomatskih egzacerbacija/relapsa dok će 20% bolesnika iskusiti relaps svake godine, a kod 67 % bolesnika periodično će se izmjenjivati razdoblja relapsa i remisije (2). Pri tome pacijenti koji su u remisiji bolesti imaju 80% šansi da u njoj ostanu i u narednoj godini, dok pacijenti s aktivnim stanjem bolesti imaju 70% šansi da ostanu u toj fazi i naredne godine (2).

Dugotrajni tijek bolesti praćen je brojnim intestinalnim i ekstraintestinalnim komplikacijama, od kojih su neke toliko su česte da se ponekad promatraju kao sastavni dio kliničke slike. Od intestinalnih komplikacija najznačajnije su opstrukcija crijeva (20-30% bolesnika; posljedica fibroze crijevne stijenke i posljedične stenoze koje mogu dovesti do potpunog prekida prolaska crijevnog sadržaja; jedna od glavnih indikacija za kiruršku resekciju crijeva), fistule (enteroenteralne, enterokutane, rektovaginalne, enterovezikalne), intra-abdominalni apscesi, perianalne lezije te perforacija crijeva (mikro perforacije i otvorene perforacije) a povećan je i rizik od pojave karcinoma tankog i debelog crijeva no ova komplikacija nije česta kao u ulceroznom kolitisu (kumulativni rizik karcinoma kolona ~3 % 10 godina i 8% kod 30 godina nakon inicijalne dijagnoze Crohnove bolesti) (83).

Ekstraintestinalne, izvancrijevne manifestacija (slika 1,5) također su česta manifestacija Crohnove bolesti (~ 25 - 46% bolesnika) (Tablica 1.14) (83).

**Tablica 1.14. Učestalost pojedinih ekstraintestinalnih komplikacija Crohnove bolesti**

<i>Ekstraintestinalne manifestacije</i>	<i>Prevalencija (%)</i>
<i>Anemija</i>	<i>9 -74</i>
<i>Anteriorni uveitis</i>	<i>17</i>
<i>Aftozni stomatitis</i>	<i>4 – 20</i>
<i>Žučni kamenci (kolelitijaza)</i>	<i>13 – 34</i>
<i>Episkleritis</i>	<i>29</i>
<i>Erytema nodosum</i>	<i>2 – 20</i>
<i>Inflamatorne artropatije</i>	<i>10 – 35</i>
<i>Nefrolitijaze</i>	<i>8 – 19</i>
<i>Osteoporoza</i>	<i>2 – 30</i>
<i>Pyoderma gangrenosum</i>	<i>0.5 – 2</i>
<i>Skleritis</i>	<i>18</i>
<i>Venska tromboembolija</i>	<i>10 – 30</i>

*Modificirano prema: Wilkins T, et al. Diagnosis and management of Crohn's disease. Am Fam Physician. 2011; 84(12):1365-75., (82).*

Tu između ostalog ubrajamo:

- hepatobilijarne komplikacije: primarni sklerozirajući kolangitis (1.4–3.5% bolesnika), perikolangitis, žučni kamenci (kolelitijaza)
- hematološke komplikacije: sideropenična anemija uslijed kroničnog gubitka krvi, megaloblastična anemija - smanjena apsorpcije vitamina B12, autoimuna hemolitička anemija, leukocitoza i trombocitoza, tromboembolijska bolest – zbog trombocitoze, povišenja faktora V, faktora VIII i fibrinogena uz sniženje antitrombina III)
- komplikacije lokomotornog sustava: artralgiya, nedestruktivni artritis, sakroileitis, ankilozantni spondilitis, batičasti prsti, osteomijelitis zdjelice
- očne promjene: iritis /uveitis, episkleritis i konjunktivitis
- kožne promjene: erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, makulopapulozni osip, urtikarija i erythema multiforme
- promjene unutar usne šupljine: aftozni stomatitis
- promjene unutar mokraćnog sustava: pijelonefritis i urolitijaza
- malnutriciju (20–50 % bolesnika): deficit disaharidaza i malapsorpcija ugljikohidrata, malapsorpcije masti, vitamina B12 i žučnih soli, malapsorpcija vitamina D i kalcija – dovodi do osteoporoza i malapsorpcija vitamina K- dovodi do hipoprotrombinemije i hemoragijske dijateze



Dijagnoza Crohnove bolesti postavlja se na temelju kliničke slike i ukupnih rezultata laboratorijskih, endoskopskih, radioloških te nuklearnomedicinskih dijagnostičkih pretraga uz nalaze patohistološke analize bioptata.

Laboratorijski nalazi korisni su pri dijagnosticiranju oboljenja, procjeni aktivnosti bolesti, identificiranju komplikacija te praćenju odgovora na terapiju (Tablica 1.15) (2, 4, 82, 84).

**Table 1.15 Laboratorijski testovi za procjenu aktivnosti bolesti i pojave komplikacija kod Crohnove bolesti**

Kategorija	Test	Inicijalno testiranje	Naknadna testiranja	Komentari
Općenito	Broj bijelih krvnih stanica (WBC, engl. white blood cells)	✓	✓	Povećan kod upalne reakcije i/ili infekcije ili sekundarno kod uporabe glukokortikoida Smanjen sa uporabom 6-merkaptopurina i azatioprina (Imuran)
	Hemoglobin i hematokrit	✓	✓	Anemija
Reaktanti akutne faze	Broj trombocita	✓	✓	Povećan kod upalne reakcije li smanjen ulije terapije (npr. azatioprin)
	C-reaktivni protein Razina sedimentacije eritrocita	✓	✓	Ukoliko su povećani mogu korelirati sa aktivnošću bolesti
Analiza stolice	Kultura uzorka stolice, analiza prisutnosti parazita i toksina <i>Clostridium difficile</i>	✓	✓	Kako bi se isključili infektivni uzročnici bolesti
Nutricijski status	Željezo, feritin, vitamin B12, folat; ukupni kapacitet vezanja željeza		✓	Smanjena apsorpcija ili povećan gubitak željeza dovodi do anemije.
	Razina albumin i pre-albumin		✓	Smanjen kod lošeg nutritivnog statusa te kod enteropatija sa gubitkom proteina
	Razina vitamina D i kalcija		✓	Sekundarno smanjenje zbog malapsorpcije, resekcije tankog crijeva ili utjecaja kortikosteroida na metabolizam vitamina D. Mjeri se kod inicijacije terapije kortikosteroidima
Komplikacije	Jetreni funkcionalni testovi	✓	✓	Da se isključi sklerozirajući kolangitis, praćenje neželjenih nuspojava terapije
	Detekcija razine krvi, nitrata i kreatinina u urei	✓	✓	Praćenje bubrenih funkcija
Dijagnoza	Razina fekalnog laktoferina i kalprotektina		✓	Surogatni biljeg za upalu crijeva. Može poslužiti za razlikovanje Crohnove bolesti i iritabilnog sindroma crijeva. Povećani kalprotektin predstavlja pouzdan indikator relapsa Crohnove bolesti (senzitivnost 80 %, specifičnost 90.7 %; pozitivni LR (engl. likelihood Ratio) 1.9; negativni LR 0.04)
	Antitijela na porine vanjske membrane <i>E. coli</i> i <i>S. cerevisiae</i> ; perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska protutijela (pANCA)		✓	Razlikovanje Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

Modificirano prema: Wilkins T, et al. *Diagnosis and management of Crohn's disease. Am Fam Physician.* 2011; 84(12):1365-75., (82).

Endoskopske (Tablica 1.13) i radiološke (Tablica 1.16) pretrage [kontrastna radiografija: barijum enema; SBE (engl. *Small bowel enteroclysis*) SBFT (engl. *Small bowel follow - through*); CT - kompjuteriziranu tomografiju; MRI - magnetsku rezonancu (engl. *Magnetic resonance imaging*); ultrasonografija] uz histološku analizu bioptata su najznačajnije za postavljanje dijagnoze, utvrđivanje anatomske distribucije upalnog procesa i identificiranje intestinalnih komplikacija kao i za utvrđivanje ekstraintestinalnih manifestacije bolesti (4, 82, 85).

**Tablica 1.16 Uobičajene radiološke pretrage koje se koriste za dijagnosticiranje upalnih bolesti crijeva \***

Test	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Pozitivni LR <sup>†‡</sup>	Negativni LR <sup>†‡</sup>	Pozitivna prediktivna vrijednost (%) <sup>†</sup>	Negativna prediktivna vrijednost (%) <sup>†</sup>
Kompjuterizirana aksijalna tomografija	84.3	95.1	3.8	0.03	79.0	96.5
MRI	93.0	92.8	2.8	0.02	73.9	98.3
Scintigrafija	87.8	84.5	1.2	0.03	55.4	96.9
Ultrasonografija	89.7	95.6	4.4	0.02	81.6	97.5

*BILJEŠKA: pretpostavljena prevalencija od 0.18% odnosno ~ 1 u 556*  
 \*—Obuhvaća Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis.  
 †—Izračunato iz senzitivnosti i specifičnosti  
 ‡—Ponderirano s obzirom na prevalenciju

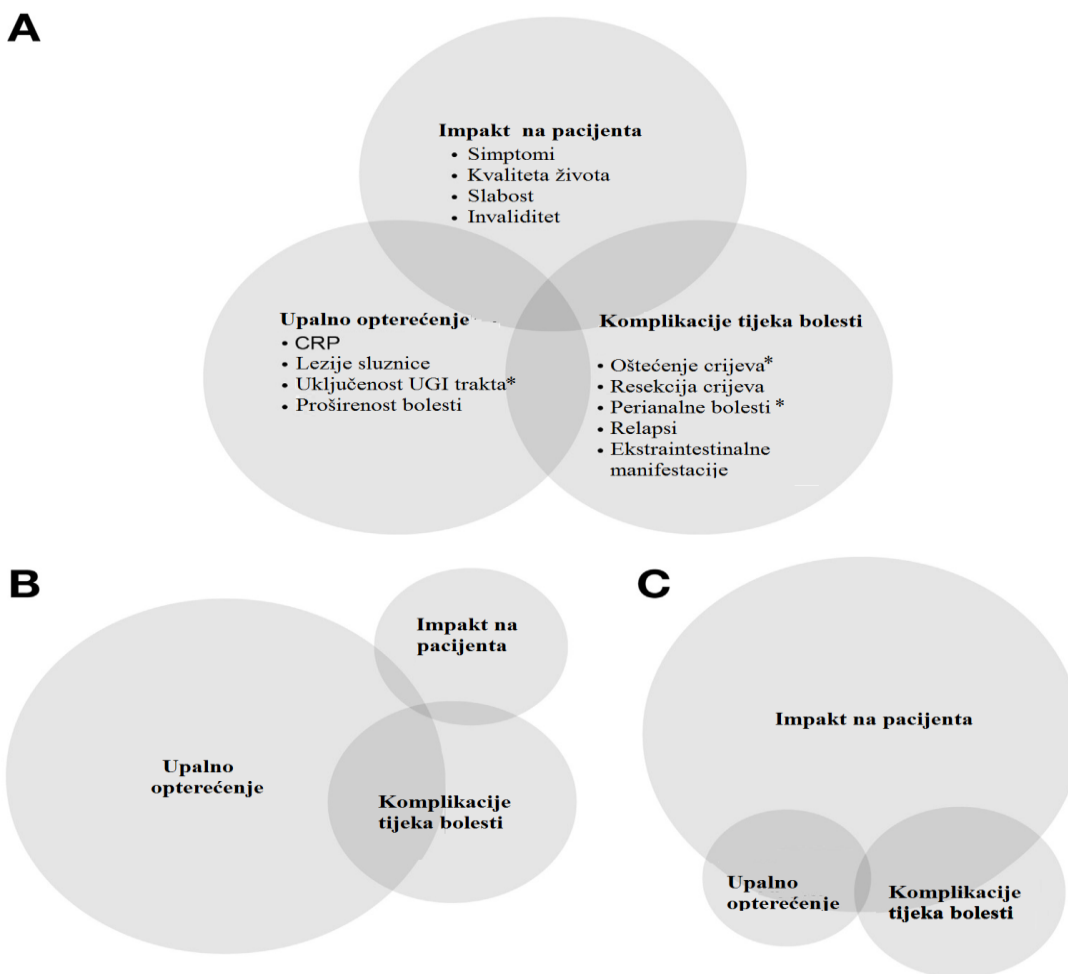
Modificirano prema: Wilkins T, et al. *Diagnosis and management of Crohn's disease. Am Fam Physician. 2011; 84(12):1365-75., (82).*

Kao i u slučaju ulceroznog kolitisa definiranje težine i stupnja upalne aktivnosti Crohnove bolesti je od izuzetne važnosti te o tome uvelike ovisi terapijski pristup pacijentu.

Kao i u slučaju ulceroznog kolitisa za utvrđivanje težine oboljenja potrebno je utvrditi:

- Utjecaj oboljenja na bolesnike: klinički simptomi, PROMs (engl. *Patient reported outcomes*), kvaliteta života te stupanj invaliditeta
- Upalno opterećenje: proširenost, anatomska lokalizacija i ozbiljnost upale u danom trenutku, razina CRP-a...
- Tijek bolesti, uključujući strukturalna oštećenja

No ovdje treba imati na umu da ovi parametri nisu međusobno isključivi pa korelacije i međusobne interakcije pojedinih parametara nisu nužno proporcionalne (slika 1.16).



**Slika 1.16** Međudnos parametara koji određuju težinu bolesti. (A) Kod određivanja ozbiljnosti/težine pojedine IBD bolesti važno je odrediti impakt bolesti na pacijente, upalno opterećenje i tijek bolesti. No ovi parametri nisu međusobno isključivi te da korelacije i međusobne interakcije pojedinih parametara nisu nužno proporcionalne. (B) Primjer međudnosa navedenih parametara kod hipotetskog pacijenta sa asimptomatskim ekstenzivnim CD ileitisom i umjereno aktivnim endoskopskim lezijama - upalno opterećenje ima najveći utjecaj na ozbiljnost bolesti. (C) Primjer međudnosa navedenih parametara kod hipotetskog pacijenta sa izoliranom, kratkom ilealnom strikturom povezanom sa opstruktivnim simptomima – Impakt na pacijenta ima najveći utjecaj na ozbiljnost bolesti. UGI- gornji probavni trakt (engl. Upper gastrointestinal tract);\* Samo u slučaju Chronove bolesti. Modificirano prema: Peyrin-Biroulet L, et al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016; 14(3):348-354.e17., (86).

Najstariji pokušaj ocjene aktivnosti bolesti baziran na kliničkim i biokemijskim parametrima - *Indeks aktivnosti Crohnove bolesti* - CDAI (engl. *Crohn's disease activity index*) razvijen je 1979. godine (60, 83, 87). Njime su, na osnovu 8 izabranih prediktorskih varijabli te zbroju njima pridruženih bodova, definirane 3 kategorije aktivnosti bolesti: blaga (150-220 bodova), umjereno aktivna (220-450 bodova) i teška (>450 bodova) bolest (Tablica 1.17) (60, 83, 87).

**Tablica 1.17 Indeks aktivnosti Crohnove bolesti - CDAI (engl. Crohn's disease activity index)**

Varijabla	Klinički nalaz	Koeficijent
Broj tekućih/mekanih stolica	tijekom 7 dana	x 2
Bol u abdomenu	tijekom 7 dana 0 = odsutna 1 = blaga 2 = umjerena 3 = teška	x 5
Općenito stanje	tijekom 7 dana 0 = dobro 1 = umjereno 2 = loše 3 = vrlo loše 4 = izrazito loše	x 7
Ekstraintestinalne komplikacije	Broj komplikacija Artritis/artralgije iritis/uveitis Erytema nodosum pyoderma gangrenosum Aftoidni stomatitis Analne fisure/fistule/apscesi Ostale fistule Febrilnost tijekom prethodnog tjedna viša od 37,2 °C	x 20
Opijati kao terapija proljeva	tijekom 7 dana 0 = ne 1 = da	x 30
Palpabilne abdominalne mase	0 = ne 1 = upitno 5 = sigurno	x 10
Hematokrit (Hct)	Očekivani-opaženi Hct Muškarci: 47 opaženo Žene: 42 opaženo	x 6
Tjelesna težina	Idealno/opaženo 1- (idealno/opaženo) x 100	x 1 (NE < -1)

Remisija: <150

Odgovor na terapiju: smanjen >70 (>100 u novijim kliničkim testiranjima)

**Blaga bolest:** 150–220; < 10% gubitka težine - bez nalaza opstrukcije, povišene temperature, rezistencije trbuhu ili napinjanja stjenke, - CRP najčešće povišen iznad donje granice

**Umjerena bolest:** 220–450; intermitentno povraćanje - gubitak težine >10% - nedjelotvorno liječenje za blagu bolest - nema znakova opstrukcije - CRP najčešće povišen iznad donje granice

**Teška bolest:** >450; - kaheksija, BMI < 18 kg/m<sup>2</sup> ili nalaz opstrukcije ili apscesa – perzistiranje tegoba unatoč intenzivnom liječenju - povišen CRP

Modificirano prema: Mazza M , et al. *Clinical Presentation of Crohn's Disease*. In: Giuseppe Lo Re, Massimo Midiri, editors. *Crohn's Disease: Radiological Features and Clinical-Surgical Correlations*. Springer International Publishing Switzerland 2016, (83).

No CDAI indeks je kompliciran za izračunavanje, zahtijeva vođenje dnevnika od strane pacijenta, veću težinu pridaje simptomima dijareje (često prouzročeni uzrocima različitim od upalne reakcije), nije prikladan za pacijente sa stomom te nije validiran za procjenu aktivnosti bolesti kod operiranih pacijenata (9, 60, 86).

Nešto kasnije razvijeni je relativno jednostavniji Harvey-Bradshaw indeks - HBI [prati samo 5 (opće stanje bolesnika; bol u trbuhu; ekstraintestinalne komplikacije; broj stolica na dan; palpabilne abdominalne mase) kliničkih varijabli (za razliku od CDAI ne prati vrijednosti za BMI, hematokrit i medikamente za terapiju dijareje); bilježi samo simptome unutar zadnja 24 sata] također ima problem objektivnog vrednovanja općih kliničkih varijabli te poput CDAI indeksa loše korelira sa parametrima mukozne upale (60, 86, 88).

**Tablica 1.18 Harvey-Bradshaw jednostavni indeks (HBI) aktivnosti Crohnove bolesti**

<b>Varijabla</b>	<b>Klinički nalaz</b>	<b>Koeficijent</b>
<i>Opće stanje</i>	<i>Dobro</i>	<i>0</i>
	<i>Srednje</i>	<i>1</i>
	<i>Loše</i>	<i>2</i>
	<i>Vrlo loše</i>	<i>3</i>
	<i>Izrazito loše</i>	<i>4</i>
<i>Bol u abdomenu</i>	<i>nema</i>	<i>0</i>
	<i>blaga</i>	<i>1</i>
	<i>umjerena</i>	<i>2</i>
	<i>ozbiljna</i>	<i>3</i>
<i>Broj tekućih stolica</i>	<i>Svaka stolica</i>	<i>1 po stolici</i>
<i>Palpabilne abdominalne mase</i>	<i>Nema</i>	<i>0</i>
	<i>Nesiguran nalaz</i>	<i>1</i>
	<i>Siguran nalaz</i>	<i>2</i>
	<i>Siguran nalaz uz bolnost</i>	<i>3</i>
<i>Ekstraintestinalne manifestacije</i>	<i>Artralgija</i>	<i>1 po varijabli</i>
	<i>Uveitis</i>	
	<i>Erythema nodosum</i>	
	<i>Aftozne ulceracije</i>	
	<i>Pyoderma gangrenosum</i>	
	<i>Analne fisure</i>	
	<i>Nove fistule</i>	
<i>Apscesi</i>		

*Remisija: <5*  
*Blaga bolest : 5–7*  
*Umjerena bolest : 8–16*  
*Teška bolest : >16*

*Modificirano prema: Mazza M , et al. Clinical Presentation of Crohn's Disease. In: Giuseppe Lo Re, Massimo Midiri, editors. Crohn's Disease: Radiological Features and Clinical-Surgical Correlations. Springer International Publishing Switzerland 2016, (83).*

S vremenom su razvijeni i indeksi za:

- ocjenu aktivnosti Crohnove bolesti tijekom različitih kliničkih studija poput primjerice *The Therapeutic Goals Score*, *The Cape Town Index*, indeks Svjetskog gastroenterološkog društva (engl. *OMGE Index*; *The index of the Organisation Mondiale de Gastro-Entérologie*) (60, 86, 89-91);
- indeksi koji kombiniraju kliničke i laboratorijske parametre koji koreliraju s upalnim parametrima bolesti [VHI- Van Heesov indeks (Nizozemski indeks)] (60, 86),
- indeksi aktivnosti koji kvantificiraju simptome Crohnove bolesti vezane uz pojavu fistula [Perianalni indeks aktivnosti Crohnove bolesti (PDAI, engl. *Perianal Disease Activity Indeks*); *Fistula Drainage Assessment* (klasificiranje otvorenih, aktualno secernirajućih ili zatvorenih enterokutanih ili perianalnih fistula)] (60, 86, 92-94).

Zbirni prikaz najvažnijih indeksa aktivnosti temeljenih na kliničkim i biokemijskim parametrima prikazan je u tablici 1.19 (60, 95).

**Tablica 1.19 Zbirni prikaz kliničkih indeksa aktivnosti Crohnove bolesti temeljenih na kliničkim i biokemijskim parametrima**

	CDAI	HARVEY-BRADSHAW INDEKS	VHI	OXFORDSKI INDEKS	CAPE TOWN INDEKS
<i>Bol u trbuhu</i>	X	X		X	X
<i>Pražnjenje stolice</i>	X	X	X	X	X
<i>Perianalne komplikacije</i>				X	X
<i>Druge komplikacije</i>	X	X	X	X	X
<i>Palpabilne mase</i>	X	X	X	X	X
<i>Tjelesna težina</i>	X			X	X
<i>Razina hemoglobina</i>	X			X	X
<i>Opće stanje</i>	X	X			X
<i>terapija proljeva</i>	X				
<i>BMI (Quetelet indeks)</i>			X		
<i>Temperatura</i>			X	X	X
<i>Serumski albumin</i>			X		
<i>ESR (sedimentacija eritrocita)</i>			X		
<i>Spol</i>			X		
<i>Resekcija crijeva</i>			X		
<i>Napetost trbuha</i>				X	X
<i>Fistule</i>				X	

*Modificirano prema: Naber AH, de Jong DJ. Assessment of disease activity in inflammatory bowel disease; relevance for clinical trials. Neth J Med. 2003; 61(4):105-10., (95).*

Budući da Crohnova bolesti ima direktan utjecaj na kvalitetu življenja bolesnika i ovdje se, kao i kod ulceroznog kolitisa, kao jedna od metoda procjene aktivnosti bolesti koriste upitnici za definiranje kvalitete življenja bolesnika kao što su CUCQ-8 ( engl. Crohn's Ulcerative Colitis Questionnaire- 8) SIBDQ (engl. *Short inflammatory bowel disease questionnaire*) te IBD kontrolni upitnik (Tablica 1.20) (60, 86, 96-103).

**Tablica 1.20 Granične vrijednosti za procjenu aktivnosti IBD (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis) bolesti na osnovi PROMs (engl. Patient-Reported Outcome Indices)**

Upitnik	Parametri koji se procjenjuju	Bodovanje	Prag ozbiljnost bolesti
IBDQ	32 pitanja povezana sa intestinalnim simptomima, sistemskim simptomima, emocionalnom i socijalnom funkcionalnošću bolesnika Dostupna i proširena verzija sa 36 pitanja	Svako pitanje boduje se po Likertovoj skali od 1 (najgore) do 7 (najbolje), što daje ukupni zbir od 32–224 (36–252 u proširenoj verziji upitnika)	Granična vrijednost od 168 bodova je prediktor CDAI-definirane remisije Crohnove bolesti Granična vrijednost od 205 bodova je pacijent - definirana remisija ulceroznog kolitisa U proširenom upitniku granična vrijednost od 209 bodova je prediktor normalne kvalitete života prema EQ-5D
Manitoba IBD Indeks	Skala pojedinačnih stavki povezana s subjektivnim izvještavanjem pacijenta o postojanju simptoma unutar prethodnih 6 mjeseci	Skala od 6 razina koje se kreću od A - moja bolest je konstantno aktivna, do F - osjećao/osjećala sam se dobro u posljednjih 6 mjeseci što smatram remisijom bolesti odnosno odsustvom simptoma	Bolest se smatra aktivnom ako pacijent ima simptome $\geq 1-2$ dana /mjesecu (zbir bodova , a–d)
Numerička skala za procjenu	Skala pojedinačnih stavki povezana s subjektivnim izvještavanjem pacijenta o sveukupnoj percepciji zdravlja	Skala od 11 točaka u rasponu od 0- loše kao da sam mrtav/mrtva, do 10- odlično zdravstveno stanje	Pacijenti koji vjeruju da se nalaze u remisiji bolesti imaju na bodovnoj skali zbirni broj bodova od $\geq 6$
IBD-Kontrolni Upitnik	13 Kategoričkih stavki vezanih uz kontrolu bolesti, zadovoljstvo terapijom, bol, energiju, emocionalnu i socijalnu funkcionalnost bolesnika 100-mm VAS u kom pacijenti rangiraju percipirani nivo kontrole bolesti	Skala u rasponu od 0–16, gdje veći zbir bodova indicira bolju kontrolu bolesti VAS se kreće u rasponu od 0 (kompletna kontrola) do 100 (najlošija kontrola)	Granična vrijednost od 13 bodova na upitniku i 85 bodova na VAS identificira pacijente sa mirujućim stadijem bolesti o

EQ-5D = EuroQol-5D; IBDQ = IBD upitnik; VAS = engl. visual analog scale

Modificirano prema: Peyrin-Biroulet Let al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016; 14(3):348-354.e17., (86).

S obzirom da endoskopija s ciljanim uzimanjem bioptičkih uzoraka sluznice predstavlja zlatni standard za određivanje lokacije, intenziteta i raširenosti upalnog procesa i literaturi se navodi niz endoskopskih indeksa za procjenu aktivnosti Crohnove bolesti od kojih su najpoznatiji:

- Endoskopski indeks aktivnosti Crohnove bolesti - CDEIS (engl. *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*) (Tablica 1.21).
- Jednostavni endoskopski bodovni system za Crohnovu bolest - SES-CD (engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*) (Tablica 1.22).
- Endoskopski bodovni sistem za postoperativni relaps bolesti [engl. *Endoscopic scoring system for postoperative recurrence (Rutgeerts score)*] (tablica 1.23) (60, 104-107).

**Tablica 1.21 Endoskopski indeks aktivnosti Crohnove bolesti - CDEIS**

	Rektum	Sigma i L kolon	Transverzum	D-kolon	Ileum	Zbroj
Duboke ulceracije (12 ako ih ima)						1.
Površne ulceracije (12 ako ih ima)						2.
Površina sluznice zauzeta bolešću (cm)						3.
Površina sluznice zauzeta ulceracijama (cm)						4.
		Suma 1 + suma 2 + suma 3 + suma 4			=	A
		Broj segmenata kompletno ili djelomično pregledan			=	N
			Suma A/n		=	B
		Ako postoji ulcerirana stenoza na bilo kojem mjestu dodaj 3			=	C
		Ako postoji neulcerirana stenoza na bilo kojem mjestu dodaj 3			=	D
			Zbroj B + C + D		=	CDEIS

Raspon bodovne skale: 0–44.

Teška bolest: CDEIS ≥ 12.

Umjereni bolest: CDEIS = 9–12.

Blaga bolest: CDEIS = 3–9.

Remisija: CDEIS = 0–3.

Ocjena ovisi o varijablama (površinske ulceracije, duboke ulceracije, površina pojedinog segmenta zauzeta bolešću i površina segmenata zauzeta ulceracijama u reprezentativnih 10 cm svakog segmenta) u 5 crijevnih segmenata (terminalni ileum, uzlazni kolon, poprečno debelo crijevo, silazni kolon i sigmoidni kolona ili rektum). Duboke ulceracije (0 odsutno; 12 prisutno); površinske ulceracije (0 odsutno; 6 prisutno); Površina zahvaćena bolešću (0–10); površina zahvaćena ulceracijama (0–10); ulcerirajuće stenoze (0 odsutno; 3 prisutno); neulcerirajuće stenoze (0 odsutno; 3 prisutno). Postotak površine zahvaćene ulceracijama i površine segmenata zauzetih bolešću rangira se od 0 (nema lezija ili nema ulceracija) do 10 (lezije i ulceracije zahvaćaju 100% površine analiziranog segmenta) Modificirano prema: Al-Bawardy B, et al. *Endoscopic and Radiographic Assessment of Crohn's Disease*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017; 46(3):493-513.



**Tablica 1.22 Jednostavni endoskopski bodovni system za Crohnovu bolest - SES-CD**

		Ileum	D-Kolon	transverzum	L-kolon	rektum	Zbroj
Veličina Ulceracije (dijametar)	Odsutno	0					
	Aftozni ulkusi, 0.1–0.5 cm	1					
	Veliki ulkusi, 0.5–2 cm	2					
	Vrlo veliki ulkusi, >2 cm	3					
Površina ulceracije	Nema	0					
	<10% segmenta	1					
	10–30% segmenta	2					
Zahvaćena površina	>30% segmenta	3					
	Nema	0					
	<50% segmenta	1					
Prisustvo stenoza	50–75% segmenta	2					
	>75% segmenta	3					
	Nema	0					
Jedna, može se proći	Jedna, može se proći	1					
	Više, mogu se proći	2					
	Nemoguć prolaz, prava stenoza	3					

Total SES-CD=

Raspon bodovne skale: 0–56.

Teška bolest: SES-CD ≥ 16.

Umjerena bolest: SES-CD = 7–15.

Blaga bolest: SES-CD = 3–6.

Inaktivna bolest: SES-CD ≤ 2.

Zbir bodova za svaku varijablu iznosi od 0 - 15, osim za stenozu, gdje varira od 0 -11, zato što predstavlja stenozu kroz koju se ne može provući endoskop te se stoga može opaziti samo jednom. Modificirano prema: Lamb CA, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. Gut. 2019 Dec; 68(Suppl 3):s1-s106., (9).

**Tablica 1.23 Endoskopski bodovni sistem za postoperativni relaps bolesti [engl. Endoscopic scoring system for postoperative recurrence (Rutgeerts score)].**

Stupanj	Endoskopski nalaz
0	Bez lezija u distalnom ileumu
1	≤ 5 aftoidnih lezija
3	Difuzni aftoidni ileitis s difuzno inflamiranom mukozom
4	Difuzna inflamacija s većim ulkusima, nodularitetom ili suženjima

Postoperativna pojava bolesti: Rutgeerts = 2 – 4. Modificirano prema: 107. Al-Bawardy B, et al. Endoscopic and Radiographic Assessment of Crohn's Disease. Gastroenterol Clin North Am. 2017; 46(3):493-513., (107).

Osim njih postoje i tzv. SBCE (engl. *Small bowel capsule endoscopy*) endoskopski indeksi poput Lewisovog (LS; engl. Lewis score) i CECDAI (engl. *Capsule Endoscopy Crohn's Disease Activity Indeks; Niv score*) indeksa koji se koriste za kvantifikaciju upalne reakcije u tankom crijevu (108, 109).

Neki od navedenih indeksa (CAI, CDEIS, SES-CD i van Hees indeks) dobro koleriraju sa vrijednostima pojedinih biomarkera za razlikovanje aktivnog od neaktivnog oblika Chronove bolesti poput primjerice serumskih vrijednosti CRP-a te fekalnih vrijednosti kalprotektina, laktoferina i neopterin (Tablica 1.24).

**Tablica 1.24 Preciznost pojedinih biomarkera u predviđanju aktivnosti ili ozbiljnosti Chronove bolesti**

Biomarker	Referenca	Pacijenti N	Procjena aktivnosti/ozbiljnosti bolesti	Grafična vrijednost	Senzitivnost %	Specifičnost, %	Pozitivna prediktivna vrijednost %	Negativna prediktivna vrijednost, %
CRP	110	150	van Hees Indeks <150	≤4 mg/L	44	100	100	66
			CDAI <220	≤4 mg/L	49	88	90	46
	111	103	CDAI ≤220	<19 mg/L	76	56		
	112	77	CDEIS <3	<5 mg/L	48	91	91	48
	113	122	SES-CD <4	<5 mg/L	68	58	88	29
	114	64	SES-CD ≤2	≤3 mg/L	50	24		
Fekalni Kalprotektin	115	78	SES-CD <2	<5 mg/L	46	86	78	61
	112	77	CDEIS <3	<200 µg/g	70	92	94	61
			CDEIS 3–9	<1000 µg/g	69	93	82	87
	114	64	SES-CD ≤2	≤94 µg/g	84	74		
	113	122	SES-CD <4	<70 µg/g	89	72	88	76
	116	87	Nema ulkusa	<250 µg/g	52	83	89	38
			Nema ulkusa >5 mm	<250 µg/g	60	80	78	62
	115	78	CDEIS <3	<250 µg/g	94	62	49	97
			CDEIS <3	<250 µg/g	71	78	79	71
	Fekalni laktoferin	112	77	CDEIS <3	<10 µg/g	66	92	94
Fekalni neopterin	115	78	CDEIS 3–9	<50 µg/g	65	96	87	83
			SES-CD ≤2	<200 pmol/g	74	73	73	74

Modificirano prema: Peyrin-Biroulet L, et al. *Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016; 14(3):348-354.e17., (86).*

Postoje također i različiti radiološki indeksi za procjenu aktivnosti Chronove bolesti kao što su:

- MaRIA (engl. *Magnetic resonance index of activity*), CDMI (engl. *Crohn's disease MRI indeks; London*)
- MEGS (engl. *Magnetic resonance enterography global score*)
- Nancy indeks
- Clermont-Ferrand Indeks (engl. *Clermont Score*)
- MR-score-S (engl. *Segmental magnetic resonance score*)
- MRI bodovni indeks za evaluaciju perianalnih fistula te

- MR bodovni sustavi za procjenu aktivnosti Chronove bolesti terminalnog ileuma (60, 76, 117-119).

Od trenutno postojećih ultrazvučnih indeksa (procjena aktivnosti bolesti s obzirom na debljinu crijevne stijenke i intenzitet krvnog optoka; manje raširena primjena izvan Europe) za procjenu aktivnosti Crohnove bolesti u literaturi se navode:

- Limbergov indeks (najraširenija primjena)
- SLIC (engl. *Sonographic lesion index for CD*) te
- Le´mannov indeks (76, 117-119).

Prednosti i nedostaci endoskopskih i radioloških pretraga u praćenju aktivnosti Crohnove bolesti prikazani su u tablici 1. 25 i 1.26

**Tablica 1.25 Prednosti i nedostaci endoskopskih pretraga u praćenju aktivnosti Crohnove bolesti**

Prednosti	Nedostaci
<p><b>ileokolonoskopija</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Direktna procjena izlječenja sluznice</li> <li>• Mogućnost uzimanja bioptata za histologiju</li> <li>• Validirani indeksi aktivnosti bolesti (CDEIS/SES-CD/Rutgeertsov Indeks)</li> <li>• Predikcija rizika od <ul style="list-style-type: none"> <li>- Relapsa</li> <li>- Otpornosti na terapiju</li> <li>- Operacije</li> <li>- Postoperativnog relapsa</li> </ul> </li> </ul> <p><b>SBCE (engl. Small bowel capsule endoscopy)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kompletna vizualizacije sluznice tankog crijeva</li> <li>• Manje invazivna od klasične endoskopije</li> <li>• Visoki dijagnostički efekt za procjenu malih lezija sluznice</li> <li>• Nedavno razvijeni indeksi za procjenu ozbiljnosti bolesti (CECDAL i Lewisov indeks)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invazivnost</li> <li>• Priprema crijeva</li> <li>• Trošak</li> <li>• Nemogućnost transmuralne evaluacije</li> <li>• Nemogućnost vizualizacije proksimalnog ileuma</li> <li>• Kontroverzne definicije izlječenja sluznice (parcijalno vs. kompletno izlječenje sluznice)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indeksi ozbiljnosti bolesti zahtijevaju daljnju validaciju na većem broju pacijenata</li> <li>• Nemogućnost uzimanja bioptata za histološku analizu</li> <li>• Trošak</li> <li>• Priprema crijeva</li> <li>• Nemogućnost transmuralne evaluacije</li> <li>• Nije svugdje dostupno</li> </ul>

CDEIS - engl. *Crohn's Disease Endoscopic index of Severity*; SES-CD - engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*

*Modificirano prema: D'Incà R, Caccaro R. Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. Clin Exp Gastroenterol. 2014;7:151-61., (119).*

**Tablica 1.26 Prednosti i nedostaci radioloških pretraga u praćenju aktivnosti Crohnove bolesti**

Prednosti	Nedostaci
<p><b>MRI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluacija tankog crijeva i kolona</li> <li>• Perianalna evaluacija</li> <li>• Procjena of transmuralne i ekstramuralne aktivnosti</li> <li>• Validirani indeksi aktivnosti (MaRiA/CDMI)</li> <li>• Nema zračenja</li> </ul> <p><b>CT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluacija tankog crijeva i kolona</li> <li>• Procjena of transmuralne i ekstramuralne aktivnosti</li> <li>• dostupnost</li> </ul> <p><b>Ultrazvuk</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluacija terminalnog ileuma i kolona</li> <li>• Procjena of transmuralne i ekstramuralne aktivnosti</li> <li>• Nema zračenja</li> <li>• Neinvazivnost</li> <li>• Mogućnost upotrebe Doppler i tzv, tehnike pospješena kontrasta (engl. contrast Enhanced techniques)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trošak</li> <li>• Vremenski zahtjevno</li> <li>• Nije svugdje dostupno</li> <li>• Zahtijeva distenziju crijeva i upotrebu oralnog i/ili rektalnog kontrasta</li> <li>• Zahtijeva intravenozni kontrastni medij</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Izloženost zračenju</li> <li>• Nepostojanje validiranih indeksa</li> <li>• Zahtijeva distenziju crijeva i upotrebu oralnog i/ili rektalnog kontrasta</li> <li>• Zahtijeva intravenozni kontrastni medij</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ograničena procjena proksimalnog ileuma, jejunuma, transverznog kolona, rektuma</li> <li>• Limitirano plinom ispunjenim crijevom, pretilošću</li> <li>• Točnost ovisna o iskustvu operatera</li> <li>• Indeks aktivnosti (SLIC) zahtijeva daljnju evaluaciju</li> </ul>

CDMI- engl. Crohn's Disease MRi index; CT, - engl. computed tomography; MaRiA - engl. Magnetic Resonance index of Activity; MRI- engl. magnetic resonance imaging; SLIC- engl. sonographic lesion index for CD

*Modificirano prema: D'Incà R, Caccaro R. Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. Clin Exp Gastroenterol. 2014;7:151-61., (119).*

Noviji podaci ukazuju na činjenicu da mikroskopska područja upalne reakcije mogu biti prisutna i u biopsijskim područjima koja endoskopski odaju izgled mirujuće bolesti (i do 1/3 bolesnika) te da se prisutnost subkliničkih, mikroskopskih upalnih lezija može dovesti u vezu sa većom učestalošću kliničkog relapsa bolesti, formiranja striktura, penetracija i potrebe za operativnim zahvatom (118, 120-125).

No, za razliku od ulceroznog kolitisa histološki indeksi za procjenu aktivnosti Crohnove bolesti manje se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi (120, 121).

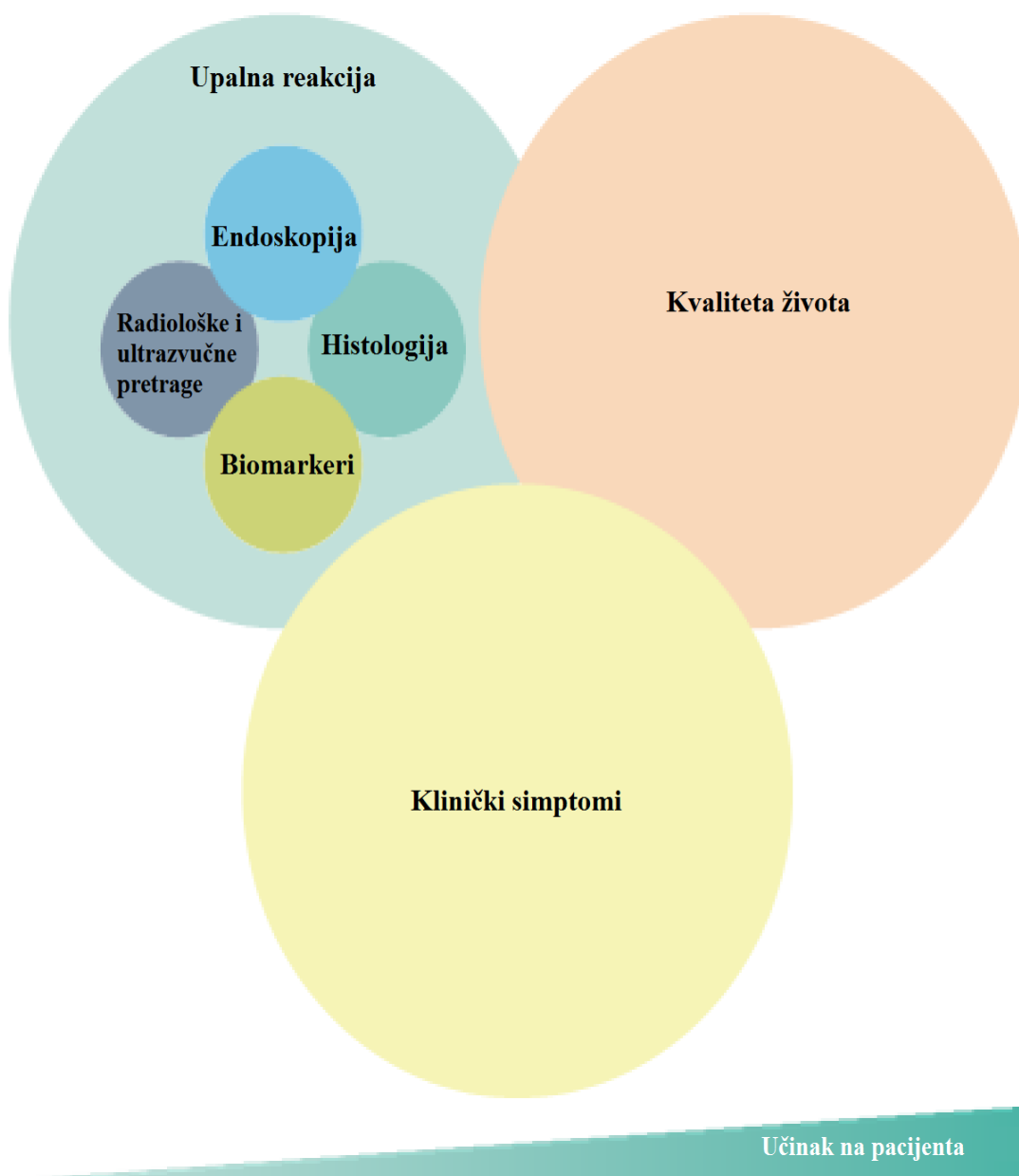
Tomu je razlog više praktičnih i konceptualnih činjenica. Neki dijelovi crijeva nedostupni su za uzimanje bioptata bilo zbog razvijene stenozе ili zbog same endoskopske tehnike koja se koristi u dijagnostici pacijenta (primjerice endoskopija kapsulom) (120, 121).

Nadalje procjena histološke aktivnosti otežana je diskontinuiranom i transmuralnom (može se procijeniti samo u resekcijskim uzorcima) prirodom upalne reakcije, a dostupan je i ograničen broj pokazatelja koji ukazuju na činjenicu koje histološke karakteristike uzorka su najoptimalnije za potvrdu postojanja aktivnog upalnog procesa (120, 121).

Trenutno je u literaturi je opisano 14 različitih numeričkih histoloških indeksa za procijenu aktivnosti Crohnove bolesti od kojih su najpoznatiji CGHAS (engl. *Colonic Global Histologic Disease Activity Score*) i IGHAS (engl. *Ileal global histologic disease activity score*) (60, 118, 120).

No zbog njihove kompleksnosti i nedostatka dokaza koji koreliraju histološku aktivnost sa ishodom bolesti niti jedan od njih se trenutno ne preporuča za rutinsku uporabu u kliničkoj praksi.

Preklapajući modaliteti za procijenu aktivnosti Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa prikazani su na slici 1.17.



**Slika 1.17** Klinički modaliteti koji se koriste u procjeni aktivnosti Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Modificirano prema: Walsh AJ, et al. Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(10):567-79., (118).

## 1.2. INCIDENCIJA I PREVALENCIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Ulcerozni kolitis predstavlja prvi oblik upalnih bolesti crijeva koji je prepoznat kao samostalni entitet. No premda je Samuel Wilks bio prvi liječnik koji je upotrijebio izraz ulcerozni kolitis (1859), opisi nezarazne kronične dijareje sežu daleko u doba Rimskog carstva i antičke Grčke (126-129). Nasuprot tome prvi opis Crohnove bolesti (ileokolitisa), potječe od Fabryja (Wilhelm Fabry = Gullielmus Fabricius Hildenus; 1612) i G. B. Morgagnija (1769; „*De Sedibus et Causis Morborum*“), a sama bolest se kao zasebni entitet spominje tek 1932 (126-129). No to ne znači da se ulcerozni kolitis pojavio prije Crohnove bolesti već je naprosto riječ o tome da su obje forme upalnih bolesti crijeva pogađale svjetsko stanovništvo (Slika 1. 18) mnogo prije no što ih je suvremena medicinska znanost bila u stanju detaljnije prepoznati i međusobno razlikovati (126-129).



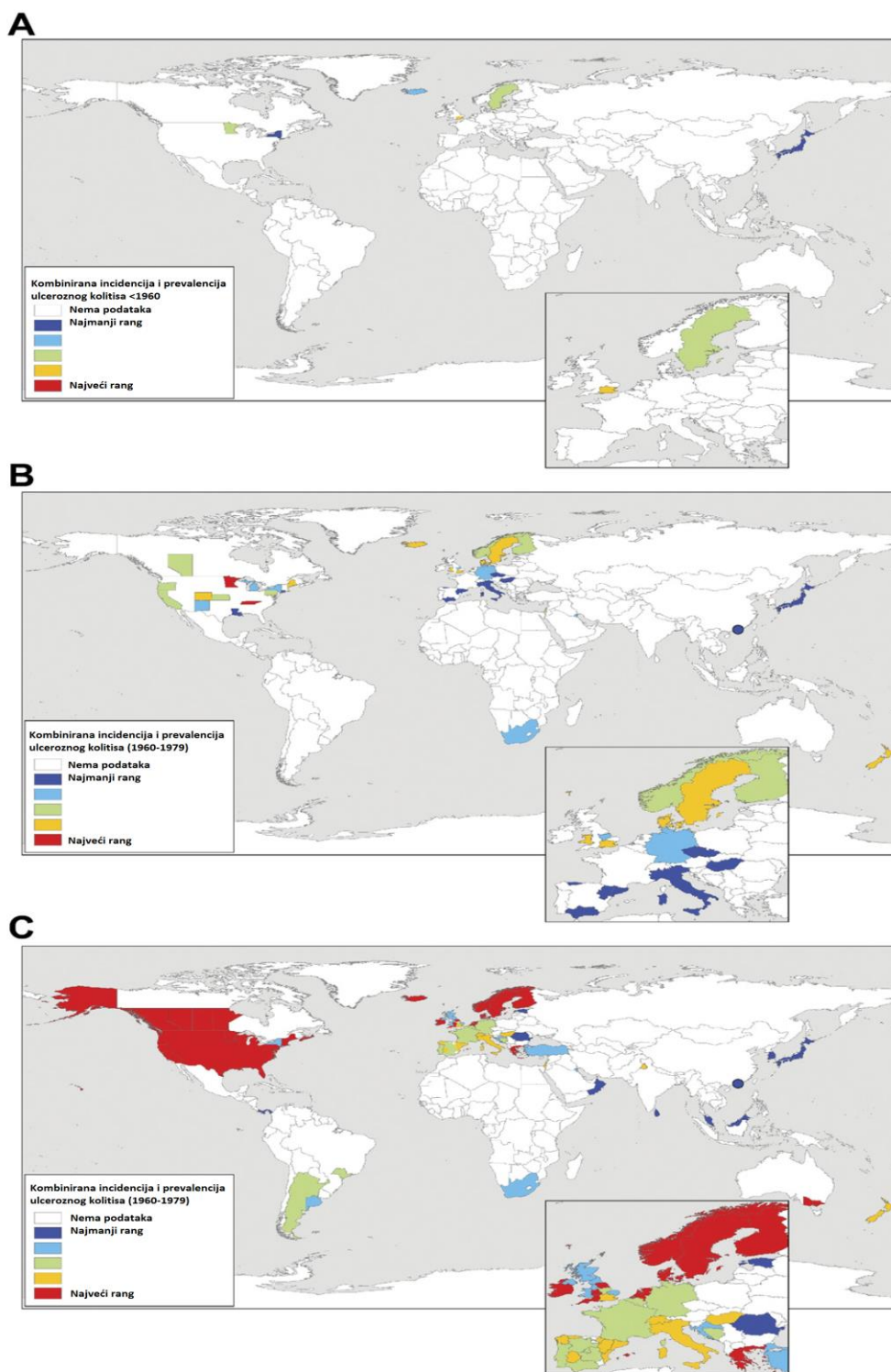
**Slika 1.18** Shematski prikaz glavnih zbivanja povezanih uz razumijevanje ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti. Modificirano prema: Mulder DJ, et al. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2014;8(5):341-8., (128).

Incidencija i prevalencija upalnih bolesti crijeva u stalnom je porastu. Opsežna studija koju su 2012 godine objavili Molodecky i suradnici pokazala je značajnu varijabilnost unutar i između različitih geografskih područja širom svijeta uz najveću incidenciju i prevalenciju IBD-a u najrazvijenijim zemljama zapadnog svijeta (slika 1.19 i 1.20). Tako je primjerice incidencija ulceroznog kolitisa na godišnjoj razini iznosila je 24.3 bolesnika / 100 000 stanovnika u Europi, 19.2/100 000 u Sjevernoj Americi te 6.3 bolesnika / 100 000 stanovnika u Aziji i na Bliskom Istoku (130). Nadalje, godišnja incidencija Crohnove bolesti iznosila je 20.2 bolesnika / 100 000 stanovnika u Sjevernoj Americi, 12.7/10 000 u Europi te 5.0/100 000 stanovnika u Aziji i na Bliskom Istoku (130). Jednako tako prevalencija ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti bila je znatno viša u visoko industrijaliziranim u odnosu na manje razvijene zemlje svijeta [Europa (UC: 505 bolesnika /100 000 stanovnika; CD: 322 bolesnika/100 000 stanovnika); Sjeverna Amerika (UC: 249 bolesnika /100 000 stanovnika; CD: 319 bolesnika/100 000 stanovnika)] (130). Razlike u spolu su se pokazale nekonzistentnima sugerirajući time podjednaku raspodjelu ulceroznog kolitisa i Chronove bolesti kod muškaraca i žena. Osim toga oba tipa upalnih bolesti crijeva pokazala su najveću incidenciju oboljenja između druge i četvrte dekade života (130).

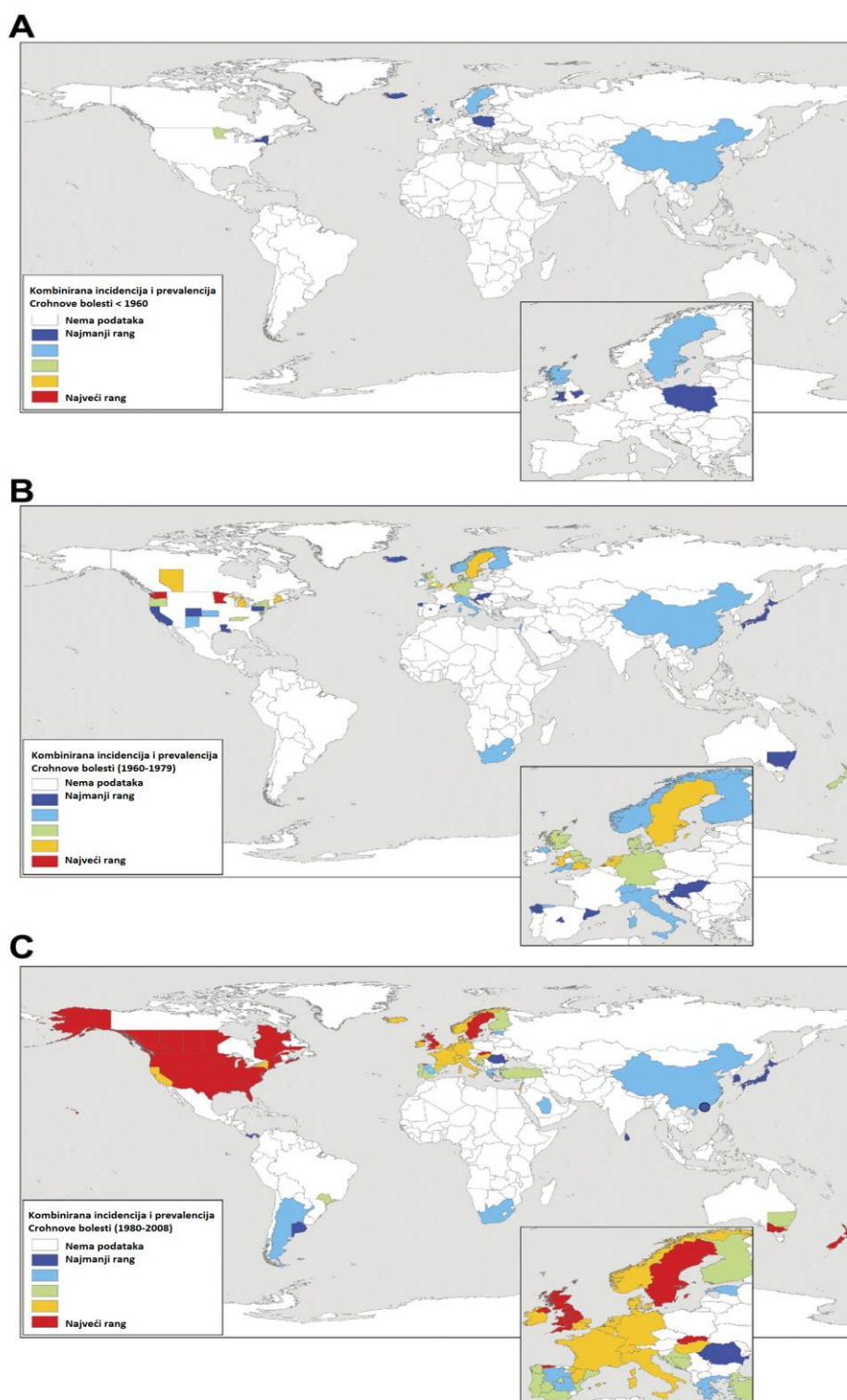
Novija epidemiološka studija Nag S. C. i suradnika iz 2018 godine potvrdila je globalnu raširenost upalnih bolesti crijeva (slika 1.21 i 1.22) ukazujući na promjenu paradigme i sve veću incidenciju i prevalenciju ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti u zemljama Afrike, Azije i Južne Amerike (slika 1. 23) koja prati zabilježeni porast u industrijalizaciji tih zemalja i njihov ubrzani prijelaz na zapadni način života (131). Osim toga, iako je u industrijski najrazvijenijim zemljama svijeta došlo do stabilizacije, a u nekima i do laganog pada u incidenciji upalnih bolesti crijeva, njihova prevalencija u općoj populaciji prešla je granicu od 0.3% stanovništva ističući time goruću potrebu za pomacima u što boljem razumijevanju etiologije oboljenja te jačem angažmanu u njejoj prevenciji i razvoju novih modaliteta terapijskog pristupa (131).

Osim toga incidencija upalnih bolesti crijeva u sve je većem porastu kod mlađih osoba, što stavlja još veći teret na zdravstveni sustav tih zemalja, pogotovu stoga što je rani nastup bolesti povezan sa većim rizikom pojave kolorektalnog karcinoma (132).

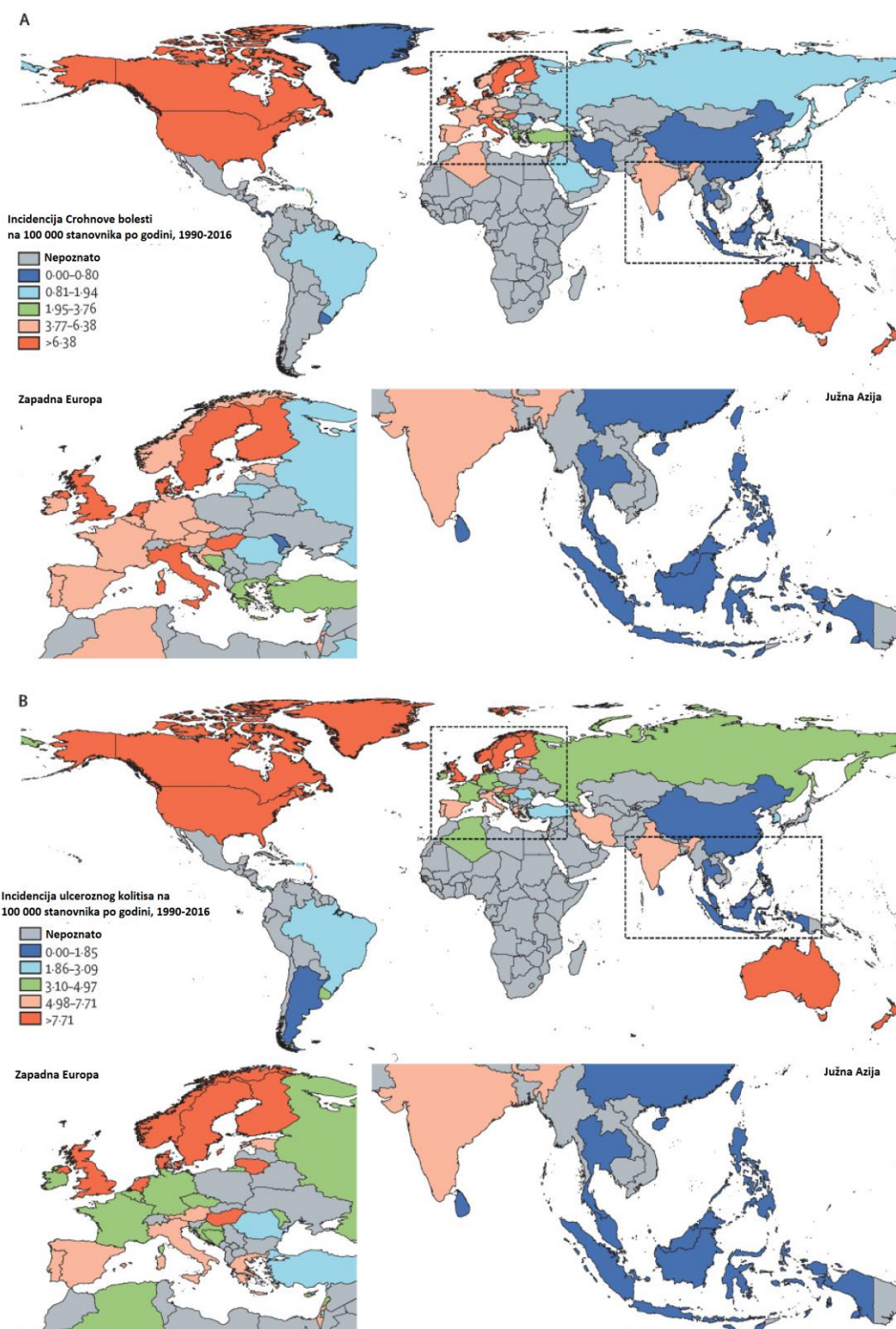




**Slika 1.19** Incidencija / prevalencija (na 100 000 stanovnika) ulceroznog kolitisa od 1960- 2008. (A) prije 1960, (B) 1960-1979, (C) 1980-2008. Incidencija i prevalencija su rangirani u kvintile koji predstavljaju malu (tamno- 0-19 percentil: 0.0–1.85/2.42–21.0; i svijetloplavo- 20-39 percentil: 1.86–3.09/21.1–44.3), srednju (zeleno- 40-59 percentil: 3.10–4.97/44.4–100.9) i visoku (žuto-60-80 percentil: 4.98–7.71/101.0–198.0; i crveno- 80-100 percentil: 7.72–19.2/198.1–298.5) pojavnost bolesti. Modificirano prema: Molodecky NA, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.; (130).

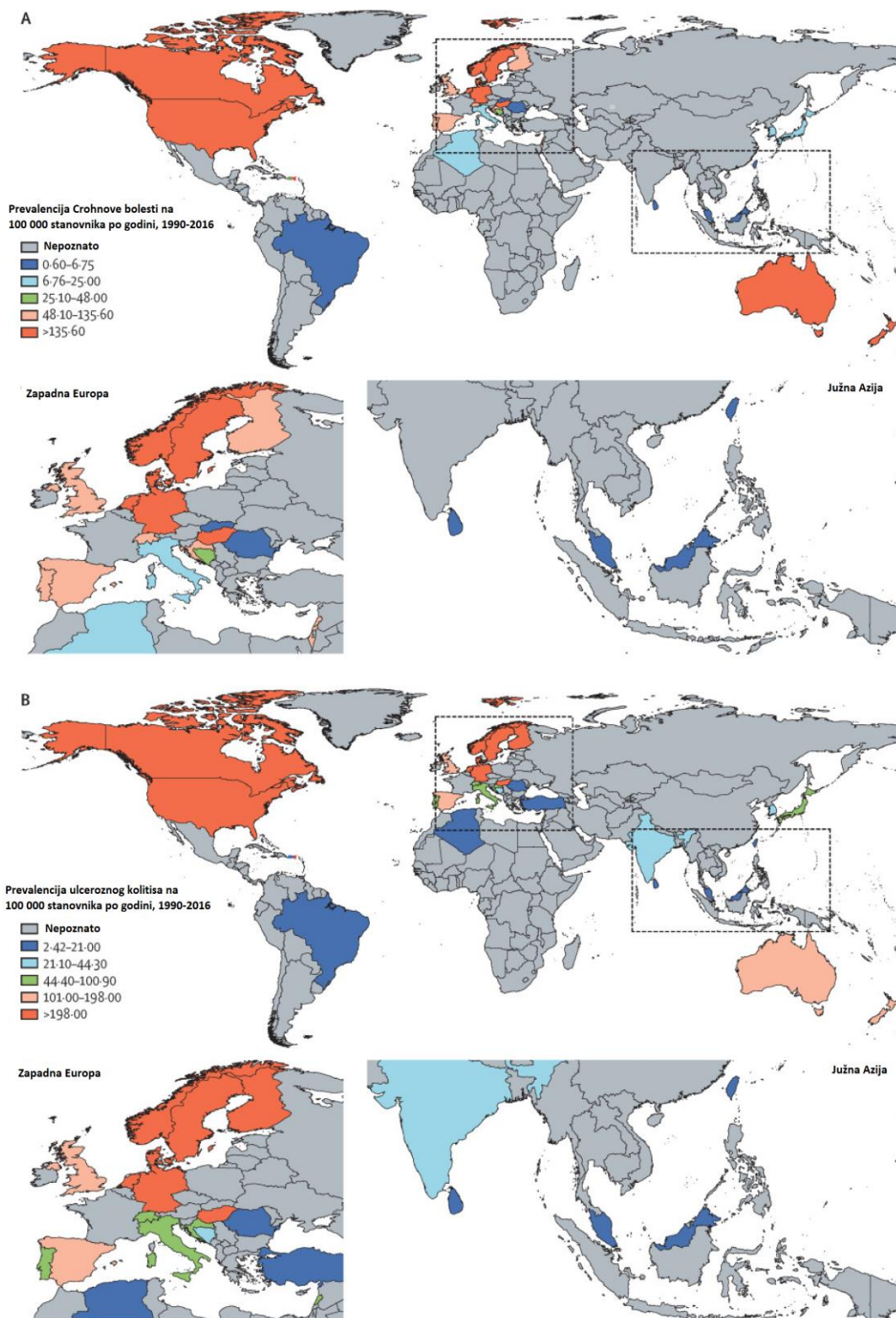


**Slika 1.20** Incidencija / prevalencija Crohnove bolesti (na 100 000 stanovnika) od 1960- 2008. (A) prije 1960, (B) 1960-1979, (C) 1980-2008. Incidencija i prevalencija su rangirani u kvintile koji predstavljaju malu (tamno- 0-19 percentil:0.0–0.80/0.6–6.75; i svijetloplavo- 20-39 percentil: 0.81–1.94/6.76–25.0), srednju (zeleno- 40-59 percentil: 1.95–3.76/25.1–48.0) i visoku (žuto-60-80 percentil: 3.77–6.38/48.1–135.6; i crveno- 80-100 percentil: 3.77–6.38/135.7–318.5) pojavnost bolesti. Modificirano prema: Molodecky NA, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.; (130).



**Slika 1.21** Incidenција Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa od 1990-2016. Modificirano prema: Ng SC, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-2778., (131).

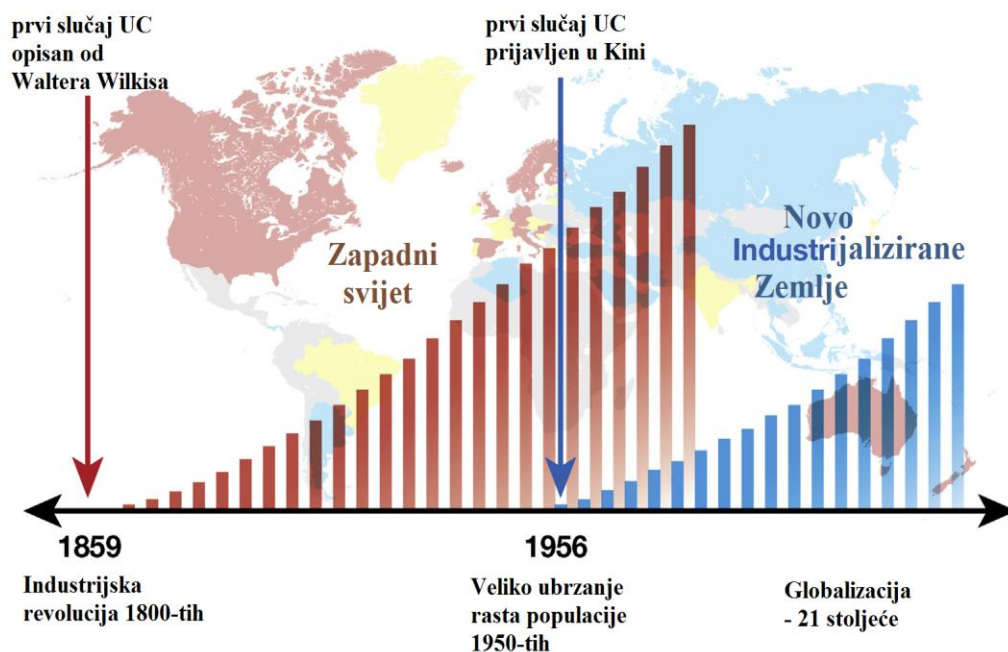




**Slika 1.22** Prevalencija Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa od 1990-2016. Modificirano prema: Ng SC, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-2778., (131).

Incidencija IBD-a u Hrvatskoj u recentno je vrijeme ispitana za grad Zagreb, Primorsko-goransku, Vukovarsko srijemsku, Zadarsku i Splitsko-dalmatinsku županiju:

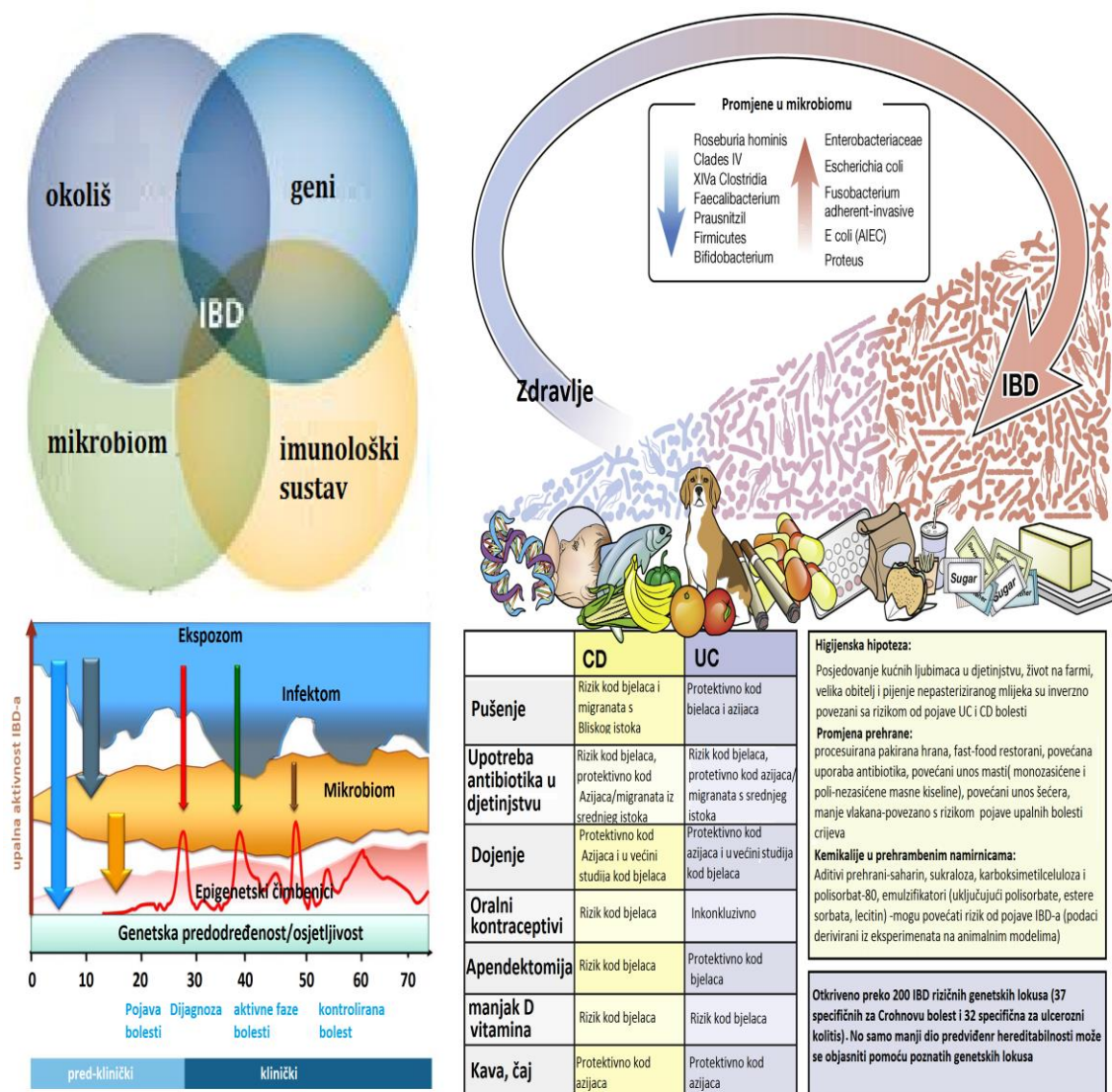
- Rijeka i Istra (1973-1994) 1.52/ 100 000 za UC i 2.92 za CD (133),
- Primorsko-goranska županija (2000-2004) 6.5/10 000 za CD, 4.5/100 000 za UC te 11.1/100 000 za IBD (134);
- Vukovarsko-srijemska županija (1991-2010) 0.95/100 000 za CD, 3.5/100 000 za UC [prevalencija 4.5/100 000 za CD, 14.5/100 000 za UC (UC+IBD), 19/100 000 za IBD] (135);
- Zadarska županija: 8.4/100 000 za CD, 8.2/100 000 za UC (UC+IBD), 16.6/100 000 za IBD [prevalencija- 111 za CD, 133.9 za UC, 244.9 za IBD] (136);
- Zagreb (1980–1989) 1.5/100 000 za UC, 0.7/100 000 za CD (137); Zagreb (137); Zagreb (2010) 3.3/100 000 za CD, 3.3/100 000 za UC, 6.6/100 000 za IBD (138);
- Splitsko-dalmatinska županija (2006-2014) 9.0/100 000 za UC (1.2 X veće kod muškaraca u odnosu na žene), 4.1/100 000 za CD (139).



*Slika 1.23 Slikovni prikaz porasta incidencije upalnih bolesti crijeva u razvijenim zemljama od 19. Stoljeća i novo industrijaliziranim zemljama svijeta od 20. stoljeća. Modificirano prema: Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 2017;152(2):313-321.e2.,(140).*

### 1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Premda je etiologija IBD-a još uvijek nepoznata smatra se da do patoloških manifestacija oboljenja dolazi složenom interakcijom genetskih/epigenetskih i okolišnih čimbenika (tzv. ekspozom), uključujući tu i higijenu, uporabu medikamenata, pojedine medicinske zahvate, način prehrane i loše životne navike (Slika 1.24), što rezultira neprimjerenim aktiviranjem imunološkog odgovora sluznice gastrointestinalnog sustava izazvanim gubitkom tolerancije na antigene uobičajene intestinalne flore (140-148).



**Slika 1.24 Slikovni prikaz čimbenika koji utječu na pojavnost upalnih bolesti crijeva.** AIEC- engl. adherent invasive E. coli. Modificirano prema: Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 2017;152(2):313-321.e2.,(140); Rogler G, et al.. The Search for Causative Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis. 2016;34 Suppl 1:48-55., (147).

### 1.3.1. ČIMBENICI OKOLIŠA

Već od samog rođenja izloženi smo različitim čimbenicima okoliša od kojih mnogi mogu imati značajan utjecaj na naše zdravstveno stanje uključujući tu i podložnost razvoju upalnih bolesti crijeva (142, 146-148). Među najznačajnije okolišne čimbenike kojima smo izloženi odmah po rođenju možemo ubrojiti dojenje, uporabu antibiotika, higijenske standarde i infekciju sa *Helicobacter pylori*.

Dojenje ima protektivni učinak na pojavnost upalnih bolesti crijeva [CD: = 2.2 (95% CI - engl. *confidence interval*- = 1.3–3.9) i UC: 1.8 puta (95% CI: 1.2–2.6) manji rizik od razvoja bolesti] dok uporaba antibiotika utječe na mikrobiom crijeva te time može pospješiti razvoj Crohnove bolesti (nema efekta na UC) (147, 148).

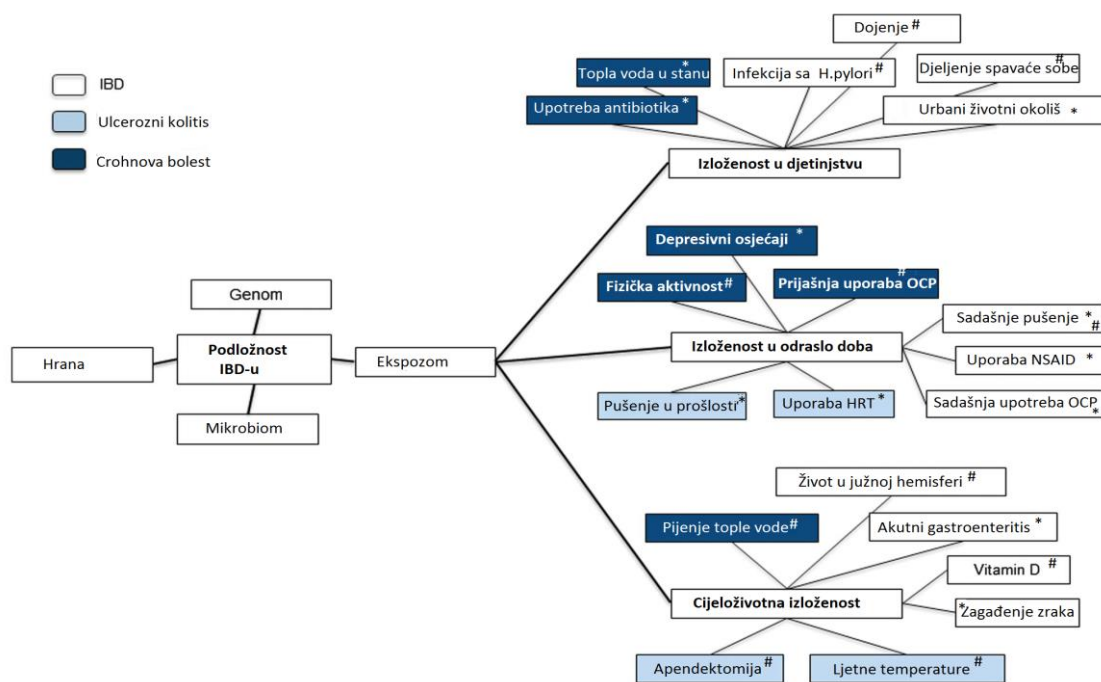
Pri tome se pojavnost Crohnove bolesti povećava zajedno sa povećanjem doze antibiotika dok uporaba antibiotika u prvoj godini života može povećati vjerojatnost (OR, engl. *odds ratio*) pojave CD-a za 5.5 puta (95% CI = (1.6–17.4). Navedena vjerojatnost smanjuje se kod uporabe antibiotika u kasnijoj dobi (6-16 godina) no i dalje ostaje signifikantna (OR =1.6, 95% CI=1.4–1.8) (147, 148). Sličan učinak na mikrobiom, prema nekim pokazateljima (nedovoljno da se odbije ili odbaci tzv. *higijenska hipoteza*) ima i higijenski standard djeteta (urbana vs. ruralna sredina, dostupnost tople vode, postojanje zasebne kupaonice, broj braće/sestara, kućni ljubimci, spavanje u zasebnom vs. zajedničkom krevetu), s tim da povećani higijenski standard smanjuje kontakt s bezopasnim mikroorganizmima što dovodi do slabije indukcije sazrijevanja dendritičkih stanica te sposobnosti reguliranja T-staničnog odgovora (slika 1.24 i 1.25) (147). Nasuprot tome, igranje sa kućnim ljubimcima, više braće i sestara, spavanje u zajedničkoj postelji itd., doprinosi većem kontaktu sa bezopasnim mikroorganizmima te ima protektivan učinak (147). Daljnji doprinos toj tzv. higijenskoj hipotezi je i činjenica da je rana ekspozicija (u djetinjstvu) sa *H. Pylori* u inverznoj korelaciji sa pojavnošću IBD-a (147, 148).

Ovdje treba napomenuti i činjenicu da povećani broj carskih rezova u zapadnom svijetu povećava pojavnost IBD-a (prenatalni i perinatalni rizični čimbenik) dok vakcinacija djece nema negativan učinak (148).



Starenjem se izloženost različitim čimbenicima okoliša mijenja (slika 1.24 i 1.25), a zbog sazrijevanja imunološkog sustava stil života poprima važniji utjecaj na pojavnost upalnih bolesti crijeva (147). Pri tome prekomjerna tjelesna masa, nedostatak fizičke aktivnosti, povećani stres, uporaba nesteroidnih inhibitora upale (NSAID, engl. *non steroid anti-inflammatory drugs*), izotretionina (sredstvo protiv akni), hormonske nadomjesne terapije (HRP, engl. *Hormone replacement therapy*) i oralnih kontraceptiva te osobito pušenje (pospješuje razvoj CD-a no ima protektivni učinak na razvoj UC-a) mogu pospješiti razvoj IBD-a (147).

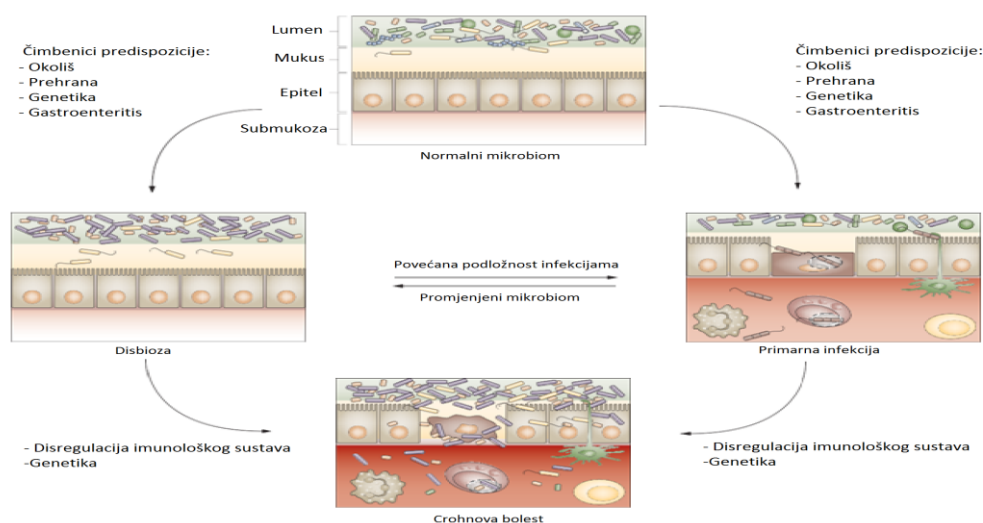
Neki od čimbenika cijeloživotne izloženosti koji imaju utjecaj na pojavnost upalnih bolesti crijeva prikazani su u tablici 1.25.



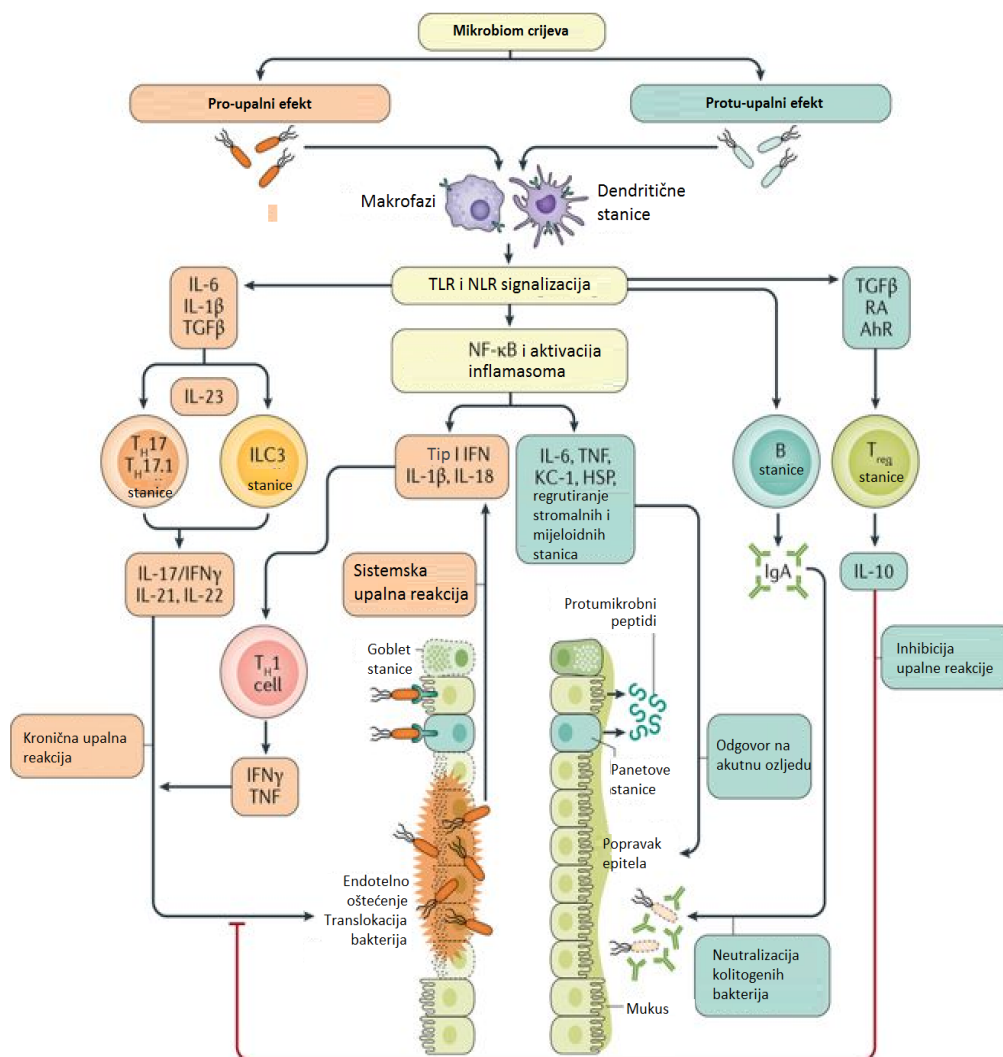
**Slika 1.25 Shematski prikaz okolišnih čimbenika koji utječu na razvoj upalnih bolesti crijeva.** OCP - engl. oral contraceptives; HRP - engl. Hormone replacement therapy; NSAID – engl. non steroid anti-inflammatory drugs \* - pospješuje pojavnost upalnih bolesti crijeva; # - ima protektivni učinak na pojavnost upalnih bolesti crijeva. Sadašnje pušenje - protektivni utjecaj na UC, negativan utjecaj na CD. Modificirano prema: Rogler Get al. *The Search for Causative Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis. 2016;34 Suppl 1:48-55., (147).*

### 1.3.2. MIKROBIOM

Mikrobiom ileuma i kolona odrasle osobe sadrži, po gramu luminalnog sadržaja, više od  $10^4$  odnosno  $10^{12}$  različitih mikroorganizama (149, 150). Osim važne uloge u digestiji unesene hrane intestinalna mikroorganizmi također sudjeluju u održavanju imunološke homeostaze unutar sluznice zdravog gastrointestinalnog trakta (149, 150). Upravo stoga disbioza (slika 1.25 i 1.26) ili neuravnoteženost u crijevnom mikrobiomu (ekspanzija patogena te smanjenje raznolikosti i stabilnosti normalno prisutnih mikroorganizama povezanih sa sluznicom odnosno fekalnim sadržajem crijeva) uzrokovana različitim čimbenicima predispozicije može dovesti do endotelne disfunkcije, narušavanja intestinalne barijere i povećane translokacije bakterija u submukozni sloj crijevne stijenke povezanih sa neodgovarajućim odgovorom imunološkog sustava (slika 1.27) na bakterijsku infekciju. Konačno sve navedeno rezultira kroničnom upalnom reakcijom karakterističnom primjerice za Crohnovu bolest ili druge upalne bolesti crijeva.



**Slika 1.26 Shematski prikaz uloge crijevnih mikroorganizama u razvoju Crohnove bolesti.** Sluznica normalnog probavnog sustava, koja je pokrivena slojem mukusa, sadrži velik broj različitih luminalnih i mukoznih bakterija (gornja slika) na koje mogu djelovati brojni čimbenici (ekspozom, genetski čimbenici) mijenjajući tako sastav crijevnog mikrobioma odnosno dovodeći do disbioze (srednja slika lijevo) koja može povećati podložnost infekcijama (srednji dio, desna slika). Isto tako infekcija probavnog sustava specifičnim vrstama mikroorganizama može također dovesti do oštećenja epitelnog sloja crijeva i disbioze crijevnog mikrobioma. Genetska predisponiranost osobe zajedno s prije navedenim čimbenicima dovodi potom do deregulacije imunološkog sustava crijevne sluznice i endotelne disfunkcije, narušavanja intestinalne barijere i povećane translokacije bakterija u submukozni sloj crijevne stijenke povezanih sa neodgovarajućim odgovorom na bakterijsku infekciju. Konačno sve navedeno rezultira kroničnom upalnom reakcijom karakterističnom primjerice za Crohnovu bolest (donja slika). Modificirano prema: Man SM, et al. The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(3):152-68.



**Slika 1.27 Pro-upalni i protu-upalni učinak mikrobioma crijeva.** Patogene mikroorganizme prepoznaju TLR (engl. Toll-like receptors) i NLR (engl. NOD-like receptors) receptori na stanicama urođenog imunološkog odgovora (dendritične stanice (DC), makrofazi) te receptori Panetovih i epitelnih stanica. To dovodi do diferencijacije TH17 (engl. Type 17 T helper cells) i ILC3 (engl. type 3 innate lymphoid cells) stanica koje se nalaze pod utjecajem TGFβ (engl. transforming growth factor beta), IL6 i IL1β (interleukin 6 i interleukin 1- beta) te aktivacijom IL23 (interleukin 23) proupalnog signalnog puta. TLR i NLR signalni put dovodi također do aktivacije NF-κB (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i inflammasoma, sekrecije proupalnih citokina i aktivacije TH1 stanica (engl. Type 1 T helper cells). Ovi signalni putovi na kraju dovode do oštećenja i disfunkcije endotela, gubitka Goblet stanica koje luče mukus te do translokacije bakterija u submukozni sloj crijevne stijenke što dalje stimulira proupalni odgovor crijevne stijenke. Protuupalne mikroorganizme također prepoznaju TLR i NLR receptori, no u ovom slučaju to preko signalnog puta TGFβ, retinoične kiseline (RA; engl. retinoic acid) i AhR (engl. aryl hydrocarbon receptor) receptora dovodi diferencijacije regulatornih T stanica (Treg). Treg stanice svoju imunoregulatorsku funkciju vrše lučenjem IL10 (interleukin 10). Nadalje aktivacija NF-κB i inflammasoma uz sekreciju anti-apoptičnih čimbenika i protumikrobnih peptida dovodi do regrutiranja stromalinih i mijeloidnih stanica neophodnih za popravak endotelnih oštećenja. Na kraju IgA (imunoglobulin A) iz B limfocita spriječava kolinogene bakterije da penetriraju kroz endotelni pokrov crijeva. Modificirano prema: Ni J, et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(10):573-584.,(150).

### 1.3.3. GENETIKA

Opažanje da se upalne bolesti crijeva grupiraju unutar obitelji otvorilo je pretpostavke o mogućem utjecaju genetskih čimbenika u patogenezi bolesti (141, 151-163).

Grupiranje je najuočljivije kod najbližih srodnika (prva generacija; 8-10 puta veći rizik razvoja bolesti u odnosu na opću populaciju) no nastavlja se i kod srodnika druge i treće generacije (141, 151-163).

Tako je primjerice obiteljska povijest IBD-a uočena u otprilike 5-16% pacijenta sa Crohnovom bolešću nasuprot 8-4% kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom (155).

Osim toga utvrđeno je da obiteljsko grupiranje upalnih bolesti crijeva kolerira sa anatomskom lokalizacijom oboljenja, ozbiljnošću bolesti i prisutnošću ekstraintestinalnih manifestacija. Isto tako pacijenti sa pozitivnom obiteljskom anamnezom imaju tendenciju ispoljavanja kliničkih simptoma bolesti u ranijoj životnoj dobi (155).

Obiteljsko grupiranje oboljenja također varira sa geografskim lokalitetom i etničkom pripadnošću bolesnika te je primjerice najizraženije kod Askhenazi židova (2-4 puta veći riziku od IBD-a u odnosu na pripadnike drugih etničkih skupina; relativni rizik za razvoj Crohnove bolesti unutar srodnika prve generacije iznosi ~ 8 % u židovskoj populaciji u odnosu na 5% kod ne-židova) a najmanje izraženo kod pripadnika latinoameričke i azijske populacije (141, 151-163).

Dodatnu potvrdu uloge genetskih čimbenika u patogenezi upalnih bolesti crijeva dala su istraživanja na parovima monozigotnih i dizigotnih blizanaca, a spoznaja da konkordantnost oboljenja kod monozigotnih blizanaca za ulcerozni kolitis iznosi 20%-55% (0-3.6% za dizigotne blizance) nasuprot 6%-16% (0-6.3 za dizigotne blizance) za ulcerozni kolitis navela je na činjenicu o važnijoj ulozi genetskih čimbenika u razvoju Crohnove bolesti (141, 151-163).

S vremenom su tzv. konsegregacijske analize povezanosti (engl. *linkage studies*) korištenjem odgovarajućih molekularnih biljega (nasljeđuju se skupa sa kliničkim

manifestacijama oboljenja) otkrile regije kromosoma odnosno DNA sekvenci koje su povezane sa pojavnošću upalnih bolesti crijeva (141, 151-163).

Prva studija analize povezanosti kod pacijenata sa Crohnovom bolešću provedena 1966 godine identificirala je prvu potencijalno odgovornu regiju za pojavnost oboljenja lociranu u pericentromernom području kromosoma 16 (164).

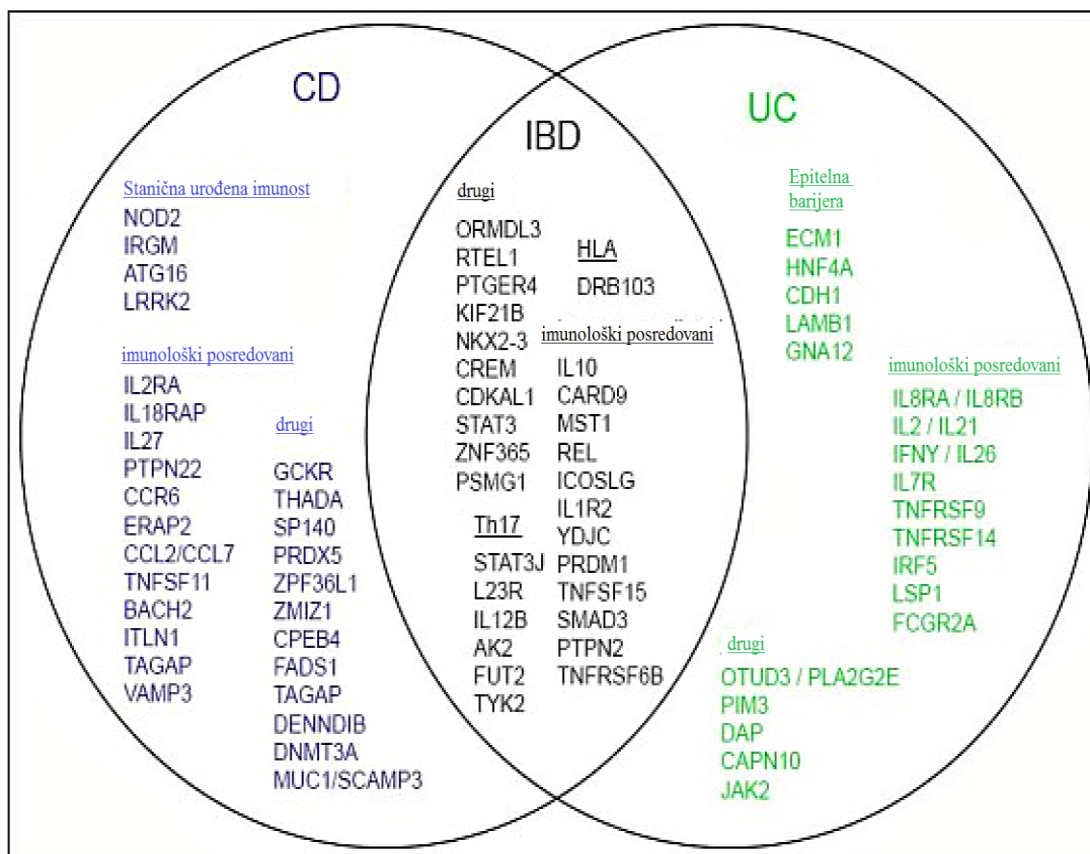
Nedugo zatim, 2001 godine unutar IBD1 regije identificirane su tri polimorfne varijable (R702W, G908R i 3020insC) smještene u NOD2/CARD15 (engl. *Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2/Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15*) genu (165-167).

U slijedećim godinama proveden je veliki broj asocijacijskih analiza u kojima je otkriven veliki broj gena koji su sa manjom ili većom uspješnošću povezani sa upalnim bolestima crijeva.

No do značajnijeg napretka dolazi tek primjenom tzv. GWAS (engl. *Genome wide association studies*; asocijacijske studije koje obuhvaćaju čitav genom) metodologije, hibridizacijskih genomskih biočipova i NGS tehnologije (engl. *next generation DNA sequencing*).

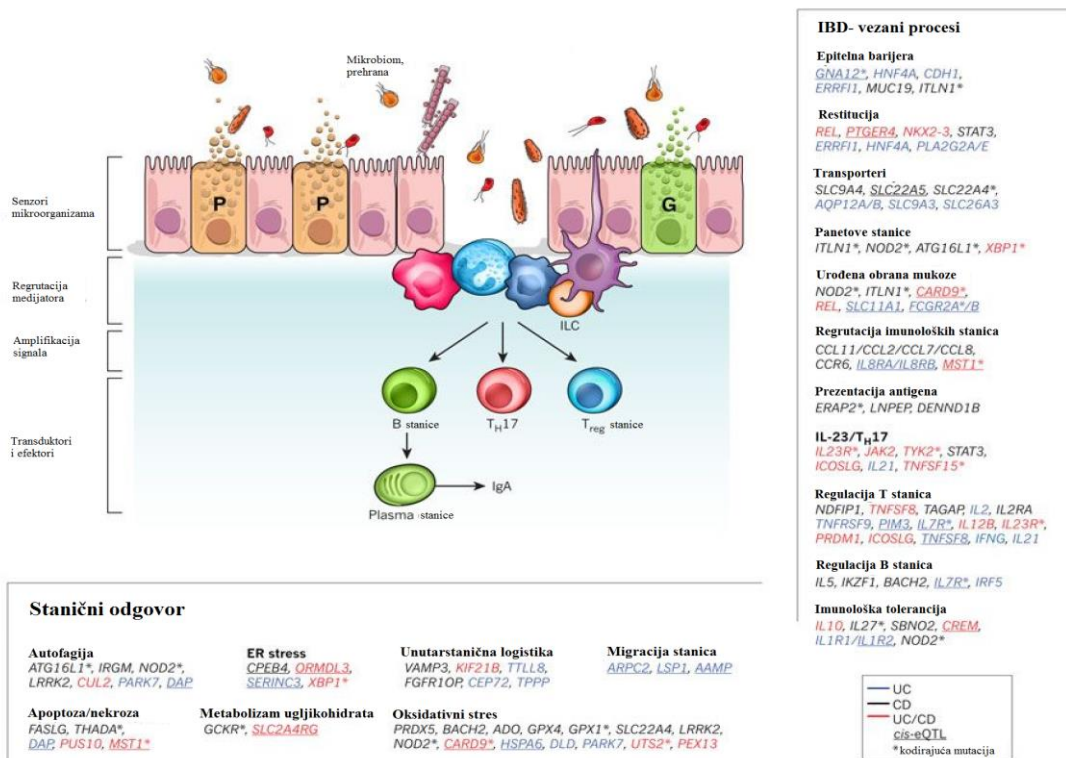
Danas je poznato >200 genskih lokusa povezanih sa pojavnošću upalnih bolesti crijeva. Neki od njih povezani su sa pojavnošću Crohnove bolesti, drugi sa pojavom ulceroznog kolutisa, dok se većina pokazala zajedničkim za oba klinička fenotipa (Slika 1.28 i 1.29).

Kromosomski položaj nekolicine važnih gena povezanih sa pojavnošću Crohnove bolesti prikazan je na slici 1.30.



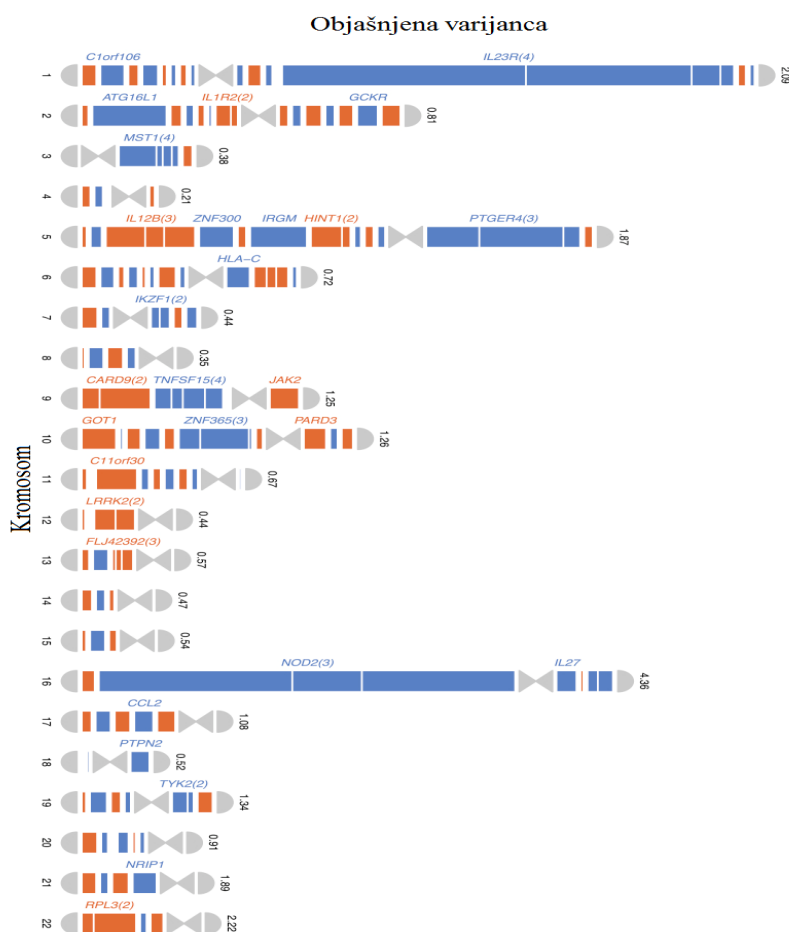
**Slika 1.28 Genski lokusi povezani sa pojavnošću upalnih bolesti crijeva. NOD2/CARD15 - engl. Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2/Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15; IRGM- engl. Immunity Related GTPase M; ATG18/ATG16- engl. Autophagy Related 16 Like 1; LRRK2- engl. Leucine Rich Repeat Kinase 2; IL2RA - engl. Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha; IL18RAP - engl. Interleukin 18 Receptor Accessory Protein; IL27 - engl. Interleukin 27; PTPN22 - engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22; CCR6 - engl. C-C Motif Chemokine Receptor 6; ERAP2 - engl. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2; CCL2/CCL7- engl. C-C Motif Chemokine Ligand 2/ C-C Motif Chemokine Ligand 7; TNFSF11- engl. TNF Superfamily Member 11; BACH2 - engl. BTB Domain and CNC Homolog 2; ITLN1 - engl. Intelectin 1; TAGAP - engl. T cell Activation RhoGTPase Activating Protein; VAMP3 - engl. Vesicle Associated Membrane Protein 3; GCKR - engl. Glucokinase Regulator; THADA - engl. THADA Armadillo Repeat Containing; SP140 - engl. SP140 Nuclear Body Protein; PRDX5- engl. Peroxiredoxin 5; ZPF36L1 - engl. RNA binding protein ZPF36L1; ZMIZ1 - engl. Zinc Finger Protein MIZ-Type Containing 1; CPEB4 - engl. Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4; FADS1 - engl. Fatty Acid Desaturase 1; DENND1B - engl. DENN Domain Containing 1B; DNMT3A - engl. DNA Methyltransferase 3 Alpha; MUC1/SCAMP3 - engl. Mucin 1/ Secretory Carrier Membrane Protein 3; ORMDL3 - engl. ORM DL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3; RTEL1 - engl. Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1; PTGER4 - engl. Prostaglandin E Receptor 4; KIF21B - engl. Kinesin Family Member 21B; NKX2-3 - engl. NK2 Homeobox 3; CREM - engl. CAMP Responsive Element Modulator; CDKAL1 - engl. CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1 Like 1; STAT3 - engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3; ZNF365 - engl. Zinc Finger Protein 365; PSMG1 - engl. Proteasome Assembly Chaperone 1; IL12B - engl. Interleukin 12B; AK2 - engl. Adenylate Kinase 2; FUT2 - engl. Fucosyltransferase 2; TYK2 - engl. Tyrosine Kinase 2; CARD9 - engl. Caspase Recruitment Domain Family Member 9; MST1 - engl. Macrophage Stimulating 1; REL - engl. REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit; ICOSLG - engl. Inducible T Cell Costimulator Ligand; IL1R2 - engl. Interleukin 1 Receptor Type 2; YDJC - engl. YdjC Chitooligosaccharide Deacetylase Homolog; PRDM1 - engl. PR/SET Domain 1; TNFSF15 - engl. TNF Superfamily Member 15; SMAD3 - engl. SMAD Family Member 3; PTPN2 - engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2; TNFRSF6B - engl. TNF Receptor Superfamily Member 6b; ECM1 - engl. Extracellular Matrix Protein 1; HNF4A - engl. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha; CDH1 - engl. Cadherin 1; LAMB1 - engl. Laminin Subunit Beta 1; GNA12 - engl. G Protein Subunit Alpha 12; IL8RA/IL8RB - engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 1/ Interleukin 8 Receptor, Alpha/ C-X-C Motif Chemokine Receptor 2/ Interleukin 8 Receptor, Beta; IL2/IL21 - engl. interleukin 2/Interleukin21; IFNY/IL26 - engl. Interferon gamma/Interleukin 26; IL7R - engl. Interleukin 7 Receptor; TNFRSF9 - engl. TNF Receptor Superfamily Member 9; TNFRSF14 - engl. TNF Receptor Superfamily Member 14; IRF5 - engl. Interferon Regulatory Factor 5; LSP1 - engl. Lymphocyte Specific Protein 1; FCGR2A - engl. Fc Fragment Of IgG Receptor Ila; OTUD3/PLA2G2E - engl. OTU Deubiquitinase 3/ Phospholipase A2 Group IIE; PIM3 - engl. Pim-3 Proto-Oncogene , Serine/Threonine Kinase; DAP - engl. Death Associated Protein; CAPN10 - engl. Calpain 10; JAK2 - engl. Janus Kinase 2. Modificirano prema: Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. Ann Gastroenterol. 2014;27(4):294-303., (168).**





**Slika 1.29** Genske varijante uključene u stanične procese indicirane u patogenezi upalnih bolesti crijeva. \* - kodirajuća mutacija; G – engl. goblet cell; P – engl. Paneth cell; ILC – engl. lymphoid cells; GNA12 – engl. G Protein Subunit Alpha 12; HNF4A – engl. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha; CDH1 – engl. Cadherin 1; ERRF11 – engl. ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1; MUC19 – engl. Mucin 19; ITLN1 – engl. Intelectin 1; REL – engl. REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit; PTGER4 – engl. Prostaglandin E Receptor 4; NKX2-3 – engl. NK2 Homeobox 3; STAT3 – engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3; ERRF11 – engl. ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1; PLA2G2A/E – engl. Phospholipase A2 Group IIE; SLC9A4 – engl. Solute Carrier Family 9 Member A4; SLC22A5 – engl. Solute Carrier Family 22 Member 5; SLC22A4 – engl. Solute Carrier Family 22 Member 4; AQP12A/B – engl. Aquaporin 12A/B; SLC9A3 – engl. Solute Carrier Family 9 Member A3; SLC26A3 – engl. Solute Carrier Family 26 Member 3; ITLN1 – engl. Intelectin 1; NOD2/CARD15 – engl. Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2/Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15; ATG16L1 – engl. Autophagy Related 16 like 1; XBP1 – engl. X-Box Binding Protein 1; CARD9 – engl. Caspase Recruitment Domain Family Member 9; SLC11A1 – engl. Solute Carrier Family 11 Member 1; FCGR2A/B – engl. Fc Fragment Of IgG Receptor Ila/ Fc Fragment Of IgG Receptor Iib; CCL11 – engl. C-C Motif Chemokine Ligand 11; CCL2 – engl. C-C Motif Chemokine Ligand 2; CCL7 – engl. C-C Motif Chemokine Ligand 7; CCL8 – engl. C-C Motif Chemokine Ligand 8; CCR6 – engl. C-C Motif Chemokine Receptor 6; IL8RA/IL8RB – engl. C-X-C Motif Chemokine Receptor 1/Interleukin-8 Receptor Type 1// C-X-C Motif Chemokine Receptor 2/Interleukin-8 Receptor Type 2; MST1 – engl. Macrophage Stimulating 1; ERAP2 – engl. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2; LNPEP – engl. Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase; DENND1B – engl. DENN Domain Containing 1B; IL23R – engl. Interleukin 23 Receptor; JAK2 – engl. Janus Kinase 2; TYK2 – engl. Tyrosine Kinase 2; ICOSLG – engl. Inducible T Cell Costimulator Ligand; IL21 – engl. Interleukin 21; TNFSF15 – engl. TNF Superfamily Member 15; NDFIP1 – engl. Nedd4 Family Interacting Protein 1; TNFSF8 – engl. TNF Superfamily Member 8; TAGAP – engl. T cell Activation RhoGTPase Activating Protein; IL2 – engl. Interleukin 2; IL2RA – engl. Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha; TNFRSF9 – engl. TNF Receptor Superfamily Member 9; PIM3 – engl. Pim-3 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase; IL7R – engl. Interleukin 7 Receptor; IL12B – engl. Interleukin 12B; PRDM1 – engl. PR/SET Domain 1; TNFSF8 – engl. TNF Superfamily Member 8; IFNG – engl. Interferon gamma; IL5 – engl. Interleukin 5; IKZF1 – engl. IKAROS Family Zinc Finger 1; BACH2 – engl. BTB Domain and CNC Homolog 2; IL7R – engl. Interleukin 7 Receptor; IRF5 – engl. Interferon Regulatory Factor 5; IL10 – engl. Interleukin 10; IL27 – engl. Interleukin 27; SBNO2 – engl. Strawberry Notch Homolog 2; CREM – engl. CAMP Responsive Element Modulator; IL1R1/IL1R2 – engl. Interleukin 1 Receptor Type 1/ Interleukin 1 Receptor Type 2; IRGM – engl. Immunity Related GTPase M; LRRK2 – engl. Leucine Rich Repeat Kinase 2; CUL2 – engl. Cullin 2; PARK7 – engl. Parkinsonism Associated Deglycase; DAP – engl. Death Associated Protein; CPEB4 – engl. Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4; ORMDL3 – engl. ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3; SERINC3 – engl. Serine Incorporator 3; VAMP3 – engl. Vesicle Associated Membrane Protein 3; KIF21B – engl. Kinesin Family Member 21B; TLLS – engl. Tubulin Tyrosine Ligase Like 8; CEP72 – engl. Centrosomal Protein 72; TPPP – engl. Tubulin Polymerization Promoting Protein; ARPC2 – engl. Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 2; LSP1 – engl. Lymphocyte Specific Protein 1; AAMP – engl. Angio Associated Migratory Cell Protein; FASLG – engl. Fas Ligand; THADA – engl. THADA Armadillo Repeat Containing; PUS10 – engl. Pseudouridine Synthase 10; GCKR – engl. Glucokinase Regulator; SLC2A4RG – engl. SLC2A4 Regulator; PRDX5 – engl. Peroxiredoxin 5; ADO – engl. 2-Aminoethanethiol Dioxxygenase; GPX4 – engl. Glutathione Peroxidase 4; GPX1 – engl. Glutathione Peroxidase 1; HSPA6 – engl. Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6; DLD – engl. Dihydrolipoamide Dehydrogenase; PARK7 – engl. Parkinsonism Associated Deglycase; UTS2 – engl. Urotensin 2; PEX13 – engl. Peroxisomal Biogenesis Factor 13; UC – ulcerozni kolitis; CD – Crohnova bolest. Modificirano prema: Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2011;474(7351):307-17., (141).

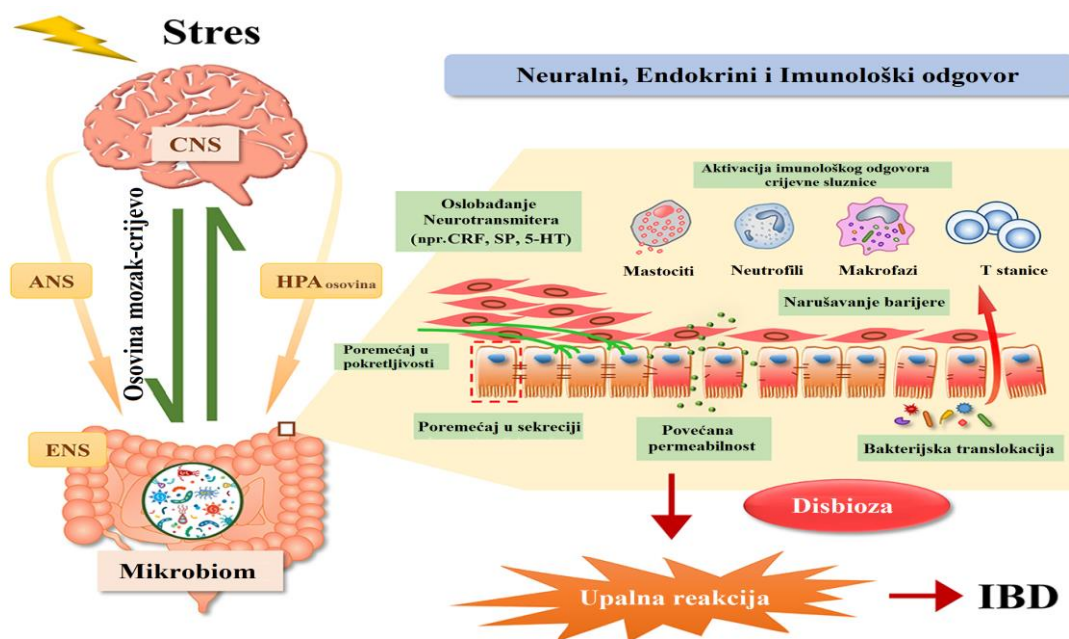




**Slika 1.30 Kromosomski položaj nekih gena bitnih u patogenezi Crohnove bolesti.** Poznati Genski lokusi rizika za pojavu Crohnove bolesti prikazani su prema njihovom položaju na dugim ili kratkim krakovima kromosoma. Veličina svakog lokusa ukazuje na udio odstupanja u odgovornosti za Crohnovu bolest objašnjen tim lokusom. Obilježeno je nekoliko značajnih gena. Zgrade pored naziva gena označavaju broj neovisnih varijanti rizika unutar lokusa. Broj iznad svakog kromosoma je omjer ukupne količine varijance koja se objašnjava tim kromosomom i očekivanog broja s obzirom na veličinu kromosoma. Seks kromosomi su isključeni jer nijedan lokus nije u cjelini potpun, uglavnom zbog toga što su ovi kromosomi previđeni u većini GWAS-a. INAVA/C1orf106 – engl. Innate Immunity Activator; IL23R – engl. Interleukin 23 Receptor; ATG16L1 – engl. Autophagy Related 16 like 1; IL1R2 – engl. Interleukin 1 Receptor Type 2; GCKR – engl. Glucokinase Regulator; MST1 – engl. Macrophage Stimulating 1; IL12B – engl. Interleukin 12B; ZNF300 – engl. Zinc Finger Protein 300; IRGM – engl. Immunity Related GTPase M; HINT1 – engl. Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1; PTGER4 – engl. Prostaglandin E Receptor 4; HLA –C – engl. Major Histocompatibility Complex, Class I, C; IKZF1 – engl. IKAROS Family Zinc Finger 1; CRD9 – engl. Caspase Recruitment Domain Family Member 9; TNFSF15 – engl. TNF Superfamily Member 15; JAK2 – engl. TNF Superfamily Member 15; GOT1- engl. Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1; ZNF365 – engl. Zinc Finger Protein 365; PARD3 – engl. Par-3 Family Cell Polarity Regulator; EMSY/c11orf30 – engl. EMSY Transcriptional Repressor, BRCA2 Interacting; LRRK2 – engl. Leucine Rich Repeat Kinase 2; LINC00548 /FLJ42392 – engl. long intergenic non-protein coding RNA 548; NOD23/CARD15 – engl. Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2/Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15; CCL2 –engl. C-C Motif Chemokine Ligand 2; PTPN2 – engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2; TYK2 – engl. Tyrosine Kinase 2; NRIP1 – engl. Nuclear Receptor Interacting Protein 1; RPL3 – engl. Ribosomal Protein L3. Modificirano prema: Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(3):373–386, (162).

## 1.4. NEUROIMUNOLOŠKE INTERAKCIJE

Interakcija psiholoških (stres, depresija), neuralnih, imunoloških i endokrinih čimbenika putem osovine mozak-crijevo koja uključuje: centralni živčani sustav (CNS; engl. *central nerve system*); hipotalamo-hipofizno-adrenergičnu (HPA) osovinu odgovora na stresna stanja; autonomni živčani sustav (ANS; engl. *autonomic nerve system*); enterički živčani sustav (ENS; engl. *enteric nerve system*) te mehanizme crijevnog odgovora [intestinalna barijera (mukoza), luminalni mikroorganizmi (mikrobiom crijeva) i intestinalni imunološki sustav (imunološki sustav crijevne sluznice)] ima važnu ulogu u patogenezi i fenotipskoj manifestaciji upalnih bolesti crijeva (slika 1.31) (169-183). Interakcija se odvija putem različitih neurotransmitera koji između ostalog utječu i na aktivnost imunoefektorskih stanica (mastocita, neutrofila, makrofaga i T limfocita) u stijenci gastrointestinalnog sustava (184-195). Najbolje proučen među njim je 5-hidroksitriptamin (5-HT) odnosno serotonin (195-218).



**Slika 1.31** Shematski prikaz interakcije psiholoških, neuralnih, imunoloških i endokrinih čimbenika putem osovine mozak-crijevo na patogenezu upalnih bolesti crijeva. ANS – engl. *autonomic nerve system*; CRF – engl. *corticotrophin releasing factor*; SP – engl. *substance P*; 5-HT – engl. *5-hydroxytryptamine*; HPA – engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*; ENS- engl. *enteric nerve system*; IBD – engl. *inflammatory bowel diseases*. Modificirano prema: Sun Y, Li L, Xie R, Wang B, Jiang K, Cao H. *Stress Triggers Flare of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adults. Front Pediatr.* 2019;7:432., (169).

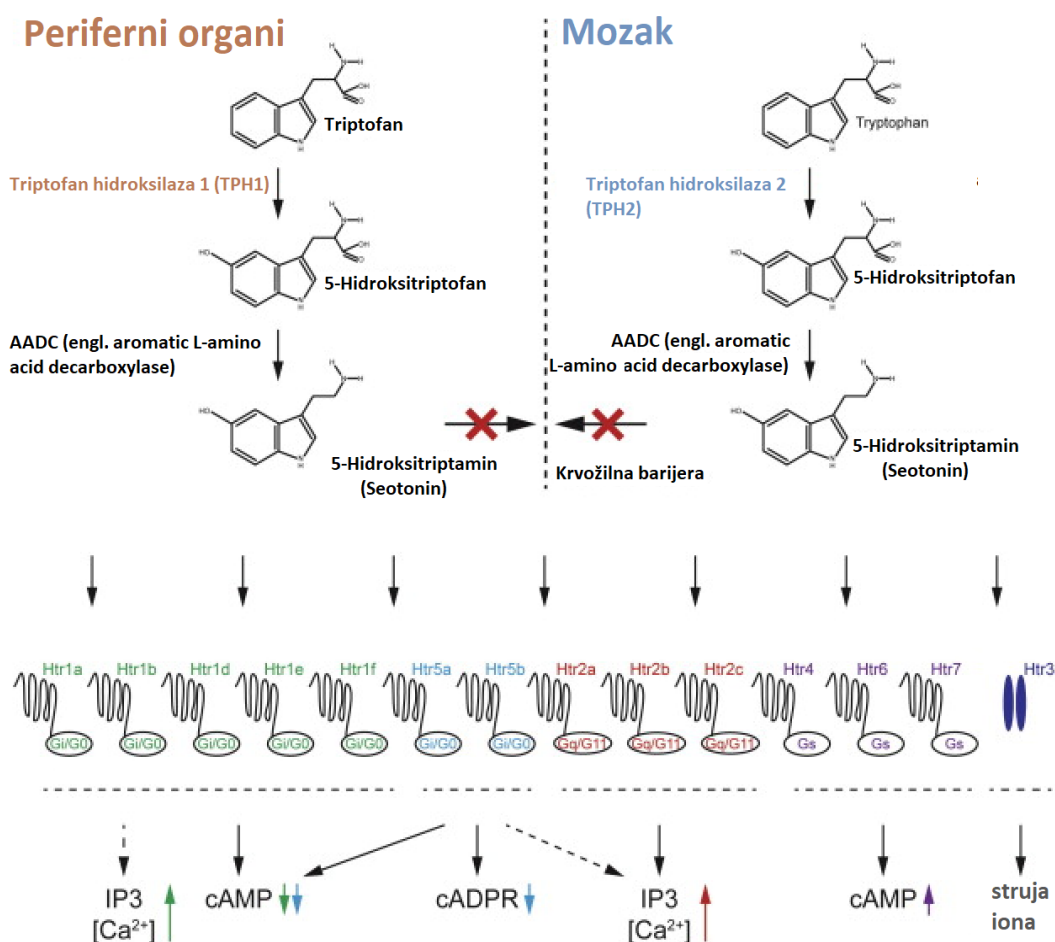
### 1.4.1. SEROTONIN (5-HT/ 5-HIDROKSITRIPTAMIN)

Serotonin (5-HT; 5-hidroksitriptamin) je monoaminski neurotransmiter prisutan u serotonergičnim neuronima centralnog (~1% ukupnog serotonina) i perifernog živčanog sustava, trombocitima (~ 2 % ukupnog serotonina) i gastrointestinalnom sustavu (~ 95 % ukupnog serotonina) (202, 203, 209, 218).

Sintetizira se iz esencijalne aminokiseline L-triptofana [serotonergični neuroni središnjeg živčanog sustava (jezgre rafe), hipofiza, enterokromafine stanice (EC) crijeva i serotonergični neuroni mezenteričkog plexusa crijeva] djelovanjem dva enzima:

- Triptofan hidroksilaze 1/2 [TPH 1 (enterokromafine stanice crijeva, mastociti - miš, štakori) i TPH2 (serotonergični neuroni središnjeg živčanog sustava); triptofan → 5-hidroksitriptofan]
- 5-OH triptofan dekarboksilaze/ dekarboksilaze L-aromatskih aminokiselina (AADC- engl. *aromatic amino acid decarboxylase*; 5-hidroksitriptofan ~ serotonin) (Slika 1.32) (202, 209, 218).

Nakon sinteze, serotonin se aktivnim transportom uz pomoć vezikularnog monoamin transportera (VMAT: VMAT1 – neuroendokrine stanice, VMAT2 – neuroni) pakira u vezikule/granule čime se izbjegava njegova oksidacija u 5—hidroksiindolactenu kiselinu (5-HIAA; engl. *5-hydroxy-indol-acetic acid*) do koje dolazi djelovanjem mitohondrijskog enzima monoamin oksidaze (MAO; engl. *monoamine oxidase*) (202). Trombociti ne sintetiziraju serotonin, već se cirkulatorni (krvna plazma) serotonin oslobođen iz gastrointestinalnog sustava aktivnim transportom pomoću serotoninskog transportera [5-HTT/SERT (engl. *serotonin reuptake transporter*; transporter za povratni unos serotonina) prisutnog u plazma membrani trombocita unosi u citoplazmu te potom aktivnim transportom uz pomoć ADP-a skladišti u vezikulama/granulama trombocita (~99% serotonina krvne plazme). Pohranjeni serotonin se iz vezikula/granula po potrebi egzocitozom (uz utok  $Ca^{2++}$  i depolarizacija membrane) otpušta u post-sinaptičku pukotinu serotonergičnih neurona (ima ulogu neurotransmitera/nuromodulatora) odnosno u izvanstranični prostor enterokromafinih stanica i trombocita (ima ulogu lokalnog parakrinog medijatora odnosno hormona) (202, 209, 211, 2012, 2018).



**Slika 1.32 Shematski prikaz sinteze i signalnog puta serotonina u mozgu i perifernim organima.** Aminokiselina L-triptofan se djelovanjem enzima triptofan hidroksilaze (TPH 1/2) i dekarboksilaze L-aromatskih aminokiselina pretvara u serotonin. U tijelu sisavaca i drugih vertebrata nalazimo dvije izoforme TPH kodirane različitim genima: TPH1 koji se eksprimira u perifernim organima i TPH2 koji se eksprimira u mozgu. Serotonin ne može prijeći krvožilnu barijeru pa zbog toga ima različitu ulogu u mozgu i perifernim organima tijela. Uloga serotonina u ciljani stanicama vrši se preko 15 specifičnih serotoninских receptora (7 podskupina) koji većina spada u obitelj GPCR receptora (engl. G-protein coupled receptors) povezanih sa djelovanjem različitih sekundarnih staničnih glasnikā dok Htr3 funkcioniра kao ligand-vezujući ionski kanal. cAMP – engl. cyclic adenosine monophosphate, cADPR – engl. cyclic adenosine diphosphate ribose, IP3 – engl. inositol trisphosphate. Modificirano prema: El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett.* 2015;589(15):1728-34., (218).

Nakon otpuštanja serotonin se veže za odgovarajuće serotoninске receptore (5-HTRs, engl. *serotonergic receptors*) prisutne na plazma membrani ciljanih stanica.

Poznato je 15 različitih serotoninских receptora, podijeljenih u 7 podskupina/obitelji (5-HTR1-5-HTR7), od koji gotovo svi metabotropni [GPCR, engl. *G-protein coupled receptors*] izuzev HTR3 (5-HTR3) koji funkcioniра kao ligand-vezujući ionski kanal najpropusniji za  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  i  $K^{+}$  (Slika 1.32 i tablica 1.27) (196, 2002, 2003, 212, 217).

**Tablica 1.27 Vrsta i distribucija serotoninergičnih receptora**

<b>Obitelj</b>	<b>Distribucija</b>	<b>Podtip</b>	<b>Ekspresija na membrani imunoloških stanica</b>
<b>5-HTR1</b>	CNS i CVS	A B D E F	Mastociti, Monociti, Makrofazi, NK stanice, T stanice, B stanice DCs, T stanice Monociti, DCs
<b>5-HTR2</b>	CNS, PNS, GI sustav, trombociti i CVS	A B C	Monociti, Makrofazi, DCs, Eozinofili, T stanice, B stanice Monociti, Makrofazi, DCs Makrofazi
<b>5-HTR3</b>	CNS, PNS, GI sustav		Monociti, DCs, T stanice, B stanice
<b>5-HTR4</b>	CNS, PNS, GI sustav, CVS		Monociti, Makrofazi, DCs
<b>5-HTR5</b>	CNS		
<b>5-HTR6</b>	CNS		
<b>5-HTR7</b>	CNS, PNS, GI sustav, CVS		Neutrofili, Monociti, Makrofazi, DCs, T stanice, B stanice

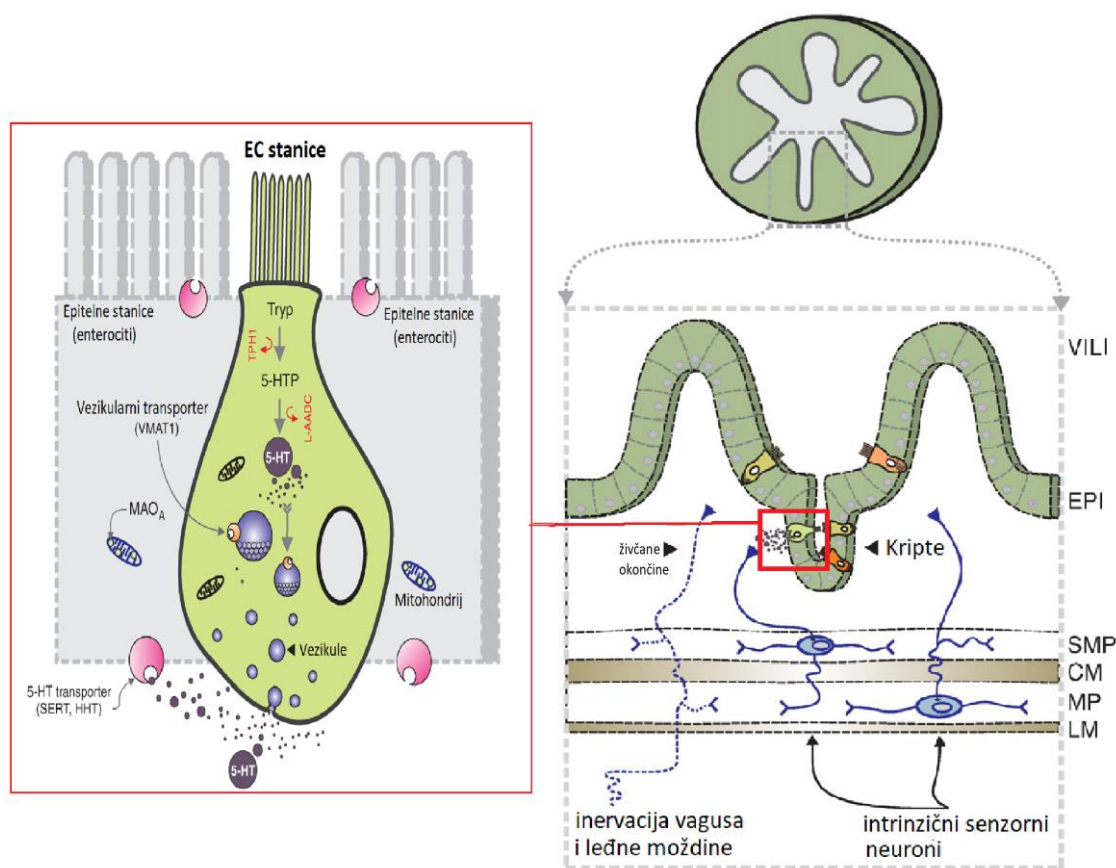
CNS – engl. central nervous system; PNS – engl. peripheral nervous system (uključuje ENS- engl. enteric nervous system); CVS – engl. cardiovascular system; GI- engl. gastrointestinal; DCs – engl. dendritic cells; NK – engl. natural killer cells. Modificirano prema: Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(3):561-74., (202).

U središnjem živčanom sustavu serotonin sudjeluje u regulaciji različitih fizioloških procesa kao što su: regulacija raspoloženja (normalno ponašanje i patogeneza depresije i anksioznih poremećaja itd.), spavanja, apetita, termoregulacije, pažnje/učenja, seksualnog ponašanja, osjeta boli, motornog tonusa i neuroendokrina regulacija (202).

U perifernom tkivu serotonin između ostalog ima ulogu u hematopoezi (potiče obnavljanje matičnih stanica hematopoeze u koštanoj srži, potiče eritropoezu i povoljno djeluje na životni vijek eritrocita), potiče stvaranje i sekreciju inzulina (ovisno o glukozi) u  $\beta$  stanicama gušterače, potiče lipolizu i suprimira lipogenezu unutar adipocita te smanjuje njihov odgovor na inzulin, smanjuje unos glukoze i potiče glukoneogenezu u stanicama jetre (5-HT iz crijeva), djelovanjem na osteoblaste sudjeluje u remodeliranju koštanog tkiva [5-HT sintetiziran u koštanom tkivu i porijeklom iz neurona CNS-a promovira rast koštanog tkiva (indukcija proliferacije osteoblasta i suprimiranje proliferacije i diferencijacije osteoklasta) dok 5-HT porijeklom iz gastrointestinalnog sustava negativno utječe na proliferaciju osteoblasta, smanjuje omjer osteoblasta/osteoklasta te na taj način promovira smanjenje gustoće koštanog tkiva] (198).

## 1.4.2. ULOGA SEROTONINA U PROBAVNOM SUSTAVU

Kao što je već spomenuto, glavna perifernog serotonina sintetizira se i potom skladišti u enterokromafinim stanicama koje se nalaze uzduž probavnog sustava s najvećom gustoćom u terminalnom ileumu i rektumu u gastrointestinalnom sustavu ljudi. Smještene su unutar epitelnog sloja sluznice crijeva s apikalnom stranom pokrivenom brojnim mikrovilima okrenutim prema lumenu crijeva dok im je bazalni dio u kontaktu sa bazalnom membranom crijevne stijenke (slika 1.33) (196, 197, 198, 209, 212).

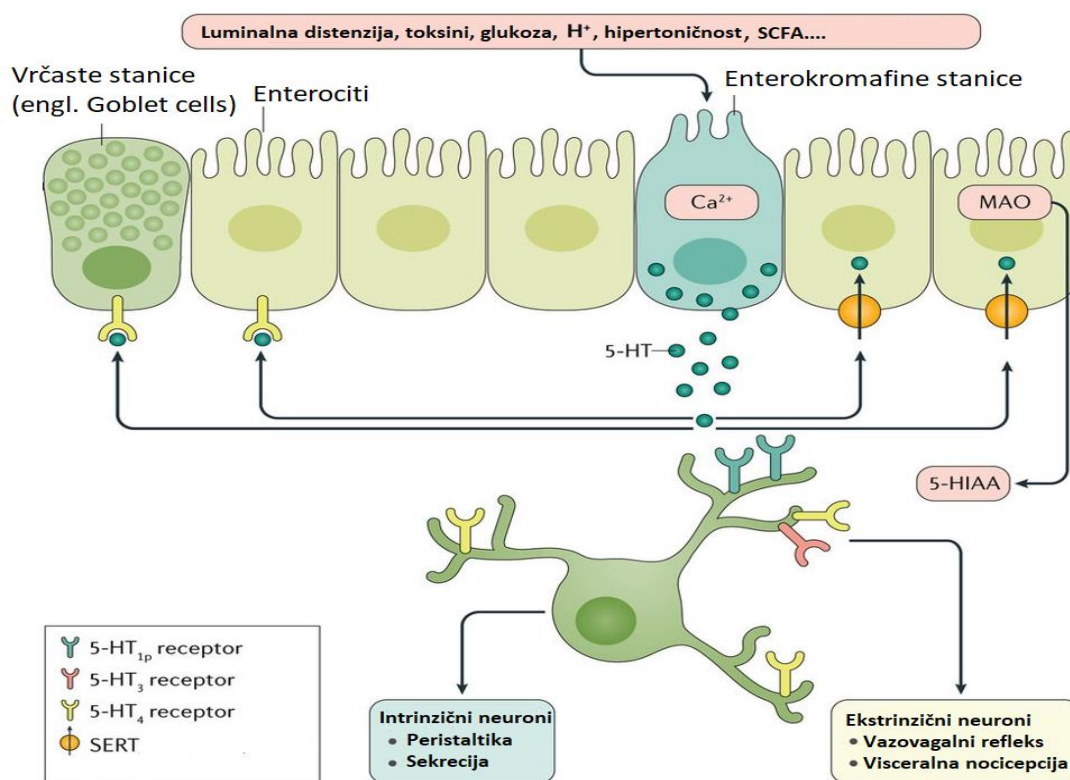


**Slika 1.33 Shematski prikaz sinteze, skladištenja i sekrecije serotonina (5-HT) u enterokromafinim stanicama probavnog sustava. Modificirano prema:** (Lijevo) enterokromafinska stanica (EC) smještena između enterocita u mukoznom sloju stijenke crijeva; 5-HT – serotonin; 5-HTP - 5-hidroksitriptofan; L-AADC - dekarboksilaza L-aromatskih aminokiselina; Tryp – triptofan; MAO – monoamino oksidaza, VMAT1 - vezikularni monoamin transporter; SERT/5-HHT – transporter za povratni unos serotonina / serotoninški transporter. (desno) EPI- epitel crijevne stijenke sa enterocitima i enteroendokrinim stanicama među kojima su i enterokromafinske stanice crijeva sa vezikulama serotonina (5-HT) kojeg otpuštaju u blizini aferentnih nervnih završetaka u lamini propriji; SMP- submukozni pleksus sa staničnim tijelima sekretomotornih, vazodilatatorskih i intrinzičnih senzornih neurona; CM – cirkularni mišićni sloj, MP – mezenterični pleksus sa staničnim tijelima motornih neurona, interneurona i intrinzičnih senzornih neurona; LM – longitudinalni sloj mišića. Modificirano prema: Bertrand PP, Bertrand RL. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.* 2010;153(1-2):47–57., (212).



Usljed djelovanja različitih čimbenika [crijevni mikrobiom i nusprodukti njegovog metabolizma (primjerice kratkolančane masne kiseline), mehanički podražaj (npr. luminalna distenzija), toksini, glukoza, H<sup>+</sup>, etc.] serotonin iz vezikula/granula smještenih u bazalnom području enterokromafinih stanica otpušta se u laminu propiju u kojoj može doći u kontakt sa živčanim završecima (živčanim okončinama) te stanicama imunološkog odgovora ili se pak otpušta u krvotok (portalna vena) gdje se aktivnim transportom (SERT/5-HTT) nakuplja u trombocitima (200, 209, 212-214, 220, 221).

Aktivacijom odgovarajućih serotonininskih receptora na plazma membrani intrinzičnih živčanih završetaka odnosno enterocita i drugih stanica crijevne sluznice (slika 1.34) može doći do inicijacije odnosno propagacije crijevnih refleksa kao što su peristaltika i sekrecija dok aktivacija ekstrinzičnih živčanih završetaka može rezultirati inicijacijom vazovagalnog refleksa ili visceralne nocicepcije (198, 209, 212, 219).

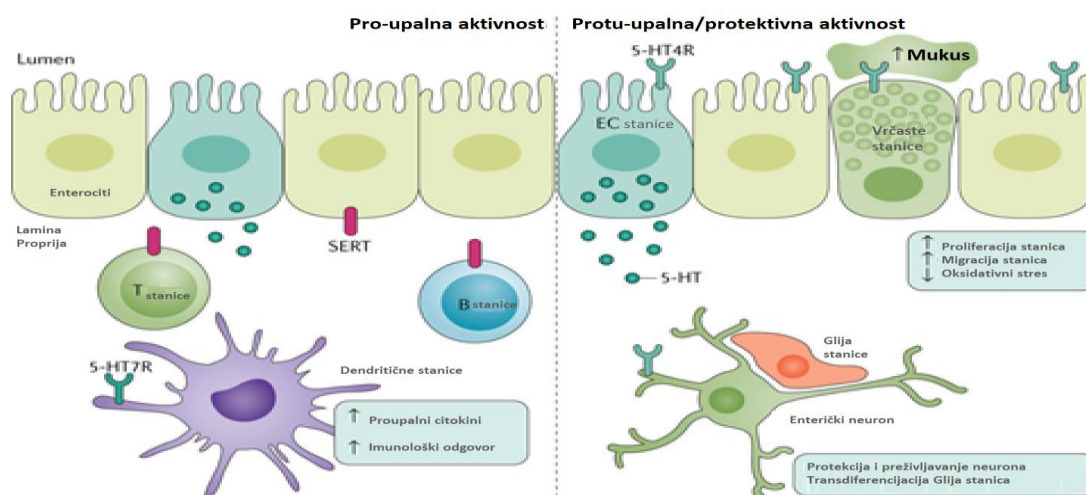


**Slika 1.34** Sekrecija serotonina u gastrointestinalnom sustavu u odgovoru na luminalni podražaj. MAO - monoamin oksidaza; 5- HIAA – 5- hidroksiindoloctena kiselina (luči se urinom), SERT – transporter za povratni unos serotonina; 5-HT – serotonin; SCFA – kratkolančane masne kiseline (engl. short chain fat acids) Modificirano prema: Spiller R, Major G. IBS and IBD - separate entities or on a spectrum? Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(10):613-21., (219).

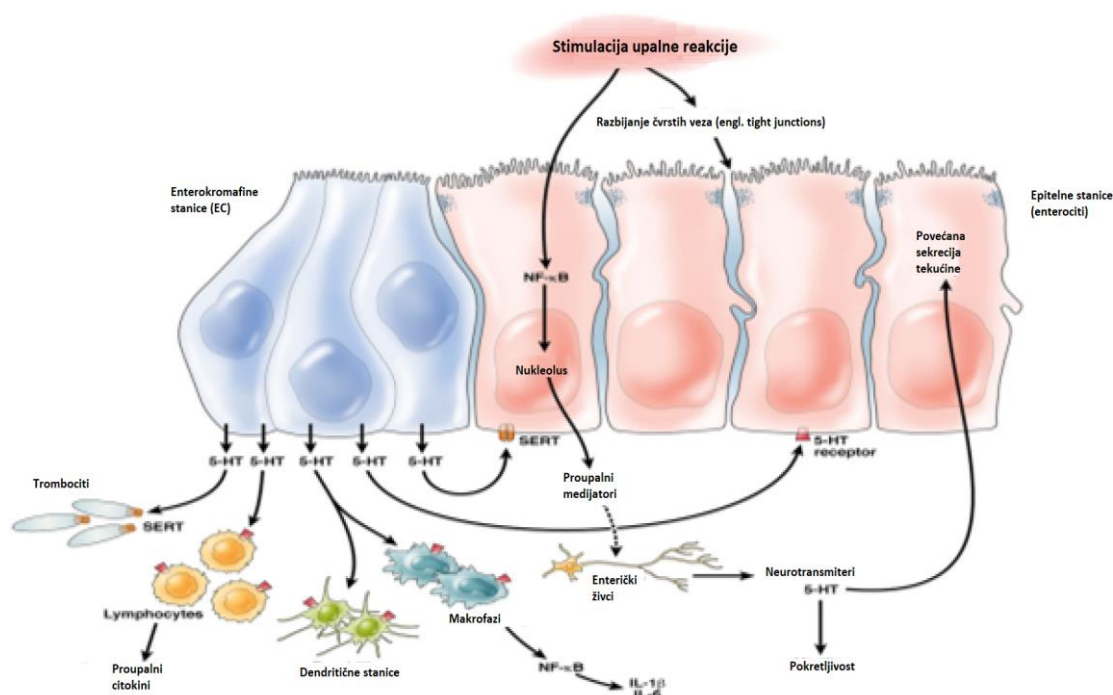


Osim djelovanja na peristaltiku i sekreciju sluznice serotonin u gastrointestinalnom sustavu može također, ovisno o uvjetima, imati protuupalnu/zaštitnu ili proupalnu funkciju (slika 1.35) (198). U protuupalnom signalnom putu, serotonin izlučen iz enterokromafinih stanica sluznice crijeva veže se na 5-HT<sub>4</sub> receptore te na taj način povećava sekreciju mukusa, poboljšava protektivnu aktivnost crijevne sluznice (uloga barijere), zacjeljivanje sluznice (povećana proliferacija stanica, smanjenje oksidativnog stresa) te također ima zaštitnu ulogu potičući preživljavanje neurona i transdiferencijaciju glija stanica (slika 1.4.5) (198).

Nasuprot tome u proupalnom odgovoru serotonin oslobođen iz enterokromafinih stanica može se, između ostalog, vezati na 5-HT<sub>7</sub> receptore dendritičkih stanica u lamini propriji te na taj način inicirati inflamatornu kaskadu. Nadalje izlučeni serotonin može, djelovanjem SERT receptora biti unesen u citoplazmu T i B limfocita, makrofaga i drugih upalnih stanica koje lučenjem citokina doprinose interakciji stečenog i urođenog imunološkog odgovora odnosno proupalnom odgovoru stijenke gastrointestinalnog sustava (slika 1.35, 1.36 i 1.37) (198, 223-226). Osim toga serotonin unesen iz portalnog krvotoka u trombocite (glavni izvor serotonina za imunološke stanice) također može, nakon njihove aktivacije, na različite načine (Slika 1.4.8) doprinijeti razvoju perifernog proupalnog odgovora (220, 223).



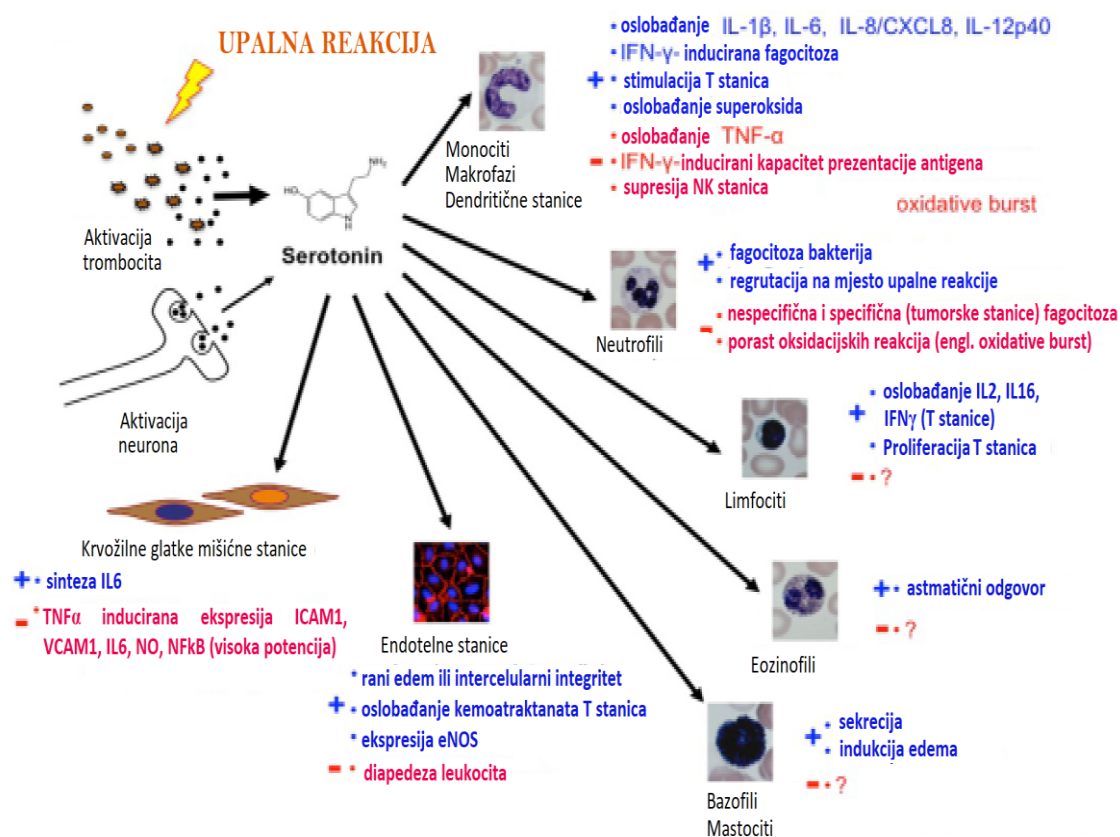
**Slika 1.35 Shematski prikaz pro-upalnog i protu-upalnog/zaštitnog djelovanja serotonina u gastrointestinalnom sustavu.** Modificirano prema: Spohn SN, Mawe GM. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(7):412-420., (198).



**Slika 1.36 Proupalni učinci gastrointestinalnog serotonina.** Modificirano prema: Margolis KG, Pothoulakis C. Serotonin has a critical role in the pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1562–1566., (222).

	Eozinofili	Mastociti	NK stanice	Makrofazi	Dendritične stanice	T limfociti	B limfociti
Stanična funkcija	Antiparazitsko Antivirusno Sekretorne granule	Antiparazitsko Sekretorne granule	Citotoksične	Fagocitoza Prezentacija antigena	Prezentacija antigena T stanicama	Stanična imunost	Sekrecija protutijela
Sinteza i transport 5-HT		TPH-1 SERT	SERT?	TPH-1	SERT	TPH-1	SERT
5-HT receptori i signalizacija	5-HT <sub>2A</sub> R Kemotaksija	5-HT <sub>1A</sub> R Kemotaksija	SSRIs [10] Povećana citolitička funkcija	5-HT <sub>1A</sub> R Fagocitoza 5-HT <sub>2A</sub> R Kemokineza	5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1E</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> Rs Kemotaksija 5-HT <sub>4</sub> , 5-HT <sub>7</sub> Rs Kemokineza	5-HT <sub>7</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>2A</sub> Rs Proliferacija	5-HT <sub>3</sub> R nepoznato SSRIs Apoptoza

**Slika 1.37 Shematski prikaz sinteze i transporta 5-HT te 5-HT receptora u različitim imunološkim stanicama.** SSRI- engl. selective serotonin reuptake inhibitors. Modificirano prema: Ahern GP. 5-HT and the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(1):29–33., (224).



**Slika 1.38 Proupalni učinci serotonina oslobođenog iz trombocita.** Modificirano prema: Herr Net al. *The Effects of Serotonin in Immune Cells. Front Cardiovasc Med.* 2017;4:48., (223).

Upalna reakcija djeluje na sve glavne aspekte serotoninskog signalnog puta uključujući tu promjene u sintezi i oslobađanju serotonina kao i u njegovom ponovni unosu djelovanjem *SERT* transportera (225).

To je potvrđeno u velikom broju studija na animalnim (miš, štakor, zamorac, pas, rezus majmuni) i *in vitro* modelima te humanom patološkom tkivu gastrointestinalnog sustava koje su između ostalog ukazale i na povezanost u alteracijama serotoninskog signalnog puta sa nekim od glavnih simptoma upalnih bolesti crijeva kao što su to proljev i bol u trbuhu (225-300).

Utjecaj upalne reakcije na serotoninski signalni put u sluznici gastrointestinalnog sustava pojedinih animalnih i *in vitro* modela te u humanom patološkom tkivu upalnih bolesti crijeva prikazani su u tablici 1.37 i 1.38.

**Tablica 1.28 Utjecaj upalne reakcije na serotoninski signalni put u sluznici gastrointestinalnog sustava u animalnom modelu upalnih bolesti crijeva**

	sadržaj 5-HT	gustoća EC stanica	oslobađanje 5-HT	Ekspresija/Funkcija 5-HT receptora	Ekspresija/Funkcija SERT transportera	Referenc a
<i>DSS</i> inducirani kolitis/štakor	↑	↑				227
<i>IL-2</i> nokaut/miš		NP				234
<i>TNBS</i> inducirani kolitis /zamorac	↑	↑	↑		↓ ( <i>mRNA</i> , <i>IR</i> )	228
<i>TNBS</i> inducirani ileitis/zamorac		↑	↑		↓ ( <i>IR</i> )	231
<i>TNBS</i> inducirani kolitis /miš					↓ ( <i>mRNA</i> , <i>IR</i> , <i>unos</i> )	236
<i>TNBS</i> inducirani kolitis /miš	↑					230
<i>TNBS</i> inducirani kolitis /zamorac		↑				229
Mouse <i>DSS</i> colitis		↑	↑		↓ ( <i>mRNA</i> )	237
<i>IL-10</i> knockout		↓				238
<i>DSS</i> inducirani kolitis/miš	↑			↑ ( <i>5-HT<sub>3R</sub></i> ), ↓ ( <i>5-HT<sub>4R</sub></i> )		239
<i>DSS</i> inducirani kolitis/ <i>IL13</i> nokaut/miš	↓	↓				235
<i>DSS</i> inducirani kolitis/ <i>IL10</i> nokaut/miš				↑ ( <i>5-HT<sub>7R</sub></i> )		240
<i>TNBS</i> inducirani kolitis /štakor		↑				232
<i>DSS</i> inducirani kolitis/miš					↓ ( <i>mRNA</i> )	241
Enteropatija/pas	↑	↑		NP ( <i>5-HT<sub>2BR</sub></i> )	NP	233

*DSS* – engl. dextran sodium sulphate; *TNBS* – engl. trinitrobenzene sulfonic acid; ↑ povećano, ↓ smanjeno, NP - nema promjene, IR - imunoreaktivnost. Modificirano prema: Coates MD et al. Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(6):569–580., (225).

**Tablica 1.29 Utjecaj upalne reakcije na serotonininski signalni put u sluznici gastrointestinalnog sustava u studijama upalnih bolesti crijeva kod ljudi.**

Humano tkivo	sadržaj 5-HT	gustoća EC stanica	oslobađanje 5-HT	Ekspresija/Funkcija 5-HT receptora	Ekspresija/ Funkcija SERT transportera	Referenca
UC	↓					268
UC i zdrava kontrole	↓					269
UC i CD	↑	↑				270
UC, kirurški odstranjeno tkivo		↑				271
UC i CD, kirurški odstranjeno tkivo	↓					272
UC, biopsije sluznice	↓	↓ (ozbiljno)	NP		↓ (mRNA, IR)	273
CaCo-2 stanice; IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ eksperiment					↓ (mRNA, unos)	274
CD, biopsije ileuma i kolona	↑ (TpH-1)	NP				275
EC stanice; IL-1 $\beta$ , LPS Eksperiment			↑			276
CaCo-2 stanice	↑				↓ (niski IL-10) ↑ (visoki IL-10)	278
IPAA	↑ (ozbiljno)					277
CD				↑ (5-HT7R)		240
Mikroskopski kolitis, UC, kontrolni ispitanici	↑					279
UC					↓	241
UC			↑ (Plazma 5-HT i 5-HIAA)	↑ (5-HT3R, 5-HT5R)		281

CaCo-2 – kontinuirana imortalizirana heterogena stanična linija adenokarcinomskih epitelnih stanica ljudskog kolona; UC – ulcerozni kolitis, CD – Crohnova bolest; IPAA – engl. ileal pouch anal anastomosis; ↑ povećano, ↓ smanjeno, NP - nema promjene, IR - imunoreaktivnost. Modificirano prema: Coates MD et al. Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(6):569–580., (225).

### 1.4.3. SERT TRANSPORTER

5-HT se nakon izlučivanja iz enterokromafinih stanica i živčanih okončina (nervnih završetaka) serotonergičnih neurona enteričkog živčanog spleta transportira kroz protein nazvan transporter ponovnog/povratnog unosa serotonina (SERT, 5-HTT – engl. *serotonin reuptake transporter/ 5-HT transporter*) koji ima kritičnu ulogu u homeostatskoj regulaciji magnitude, trajanja i prostorne raspodjele signala koji dosežu serotoninske homo- i hetero receptorske komplekse smještene na plazma membrani ciljanih stanica [primjerice intrinzični i ekstrinzični neuroni crijevne stijenke, enterociti i vrčaste (engl. *goblet cells*) stanice u sluznici crijeva te dendritične stanice u lamini propriji] (212, 217, 225, 296). Zbog toga promjene u ekspresiji i/ili aktivnosti SERT proteina mijenjaju ekspresiju i/ili funkciju većine, ako ne i svih, serotoninskih receptora, kao i sintezu, dostupnost, klirens i metabolizam serotonina (212, 217, 225, 296).

SERT je monomerni integralni transmembranski protein koji spada u SLC6 obitelj natrij- i klor-ovisnih neurotransmiterskih transportnih proteina odgovornih za unos aminokiselina i biogenih amina iz ekstracelularnog prostora kao što su dopamin, norepinefrin, GABA (engl. *γ-aminobutyric acid*) i glicin (301).

Poput svih proteina iz ove skupine građen je od 12 transmembranskih domena (TM1-TM12; slika 1.4.9), velike izvanstanične petlje (između TM3 i TM4) koja sadrži potencijalna mjesta N-glikozilacije te citoplazmatskog N- (amino) i C- (karboksilnog) kraja koji sadrži potencijalna mjesta za fosforilaciju (301).

Human *SERT (SLC6A4)* gen obuhvaća 37,8 kb na kromosomu 17q11.2, a sastoji se od četrnaest egzona koji kodiraju protein od 630 aminokiselina (302).

SERT gen ima nekoliko polimorfnih lokusa (slika 1.39) koji mogu utjecati na njegovu ekspresiju i/ili funkciju (296, 297, 303). Tri od njih najopsežnije su proučavana, a frekvencija njihovih alela i genotipova varira (slika 1.40) u različitim etničkim, demografskim i geografskim skupinama stanovništva (304, 305, 306).

Tu ubrajamo 17–18 bp (parova baza; engl. *base pairs*) dugi VNTR (varijabilni broj uzastopnih ponavljanja; engl. *variable number of tandem repeats*) smješten u drugom

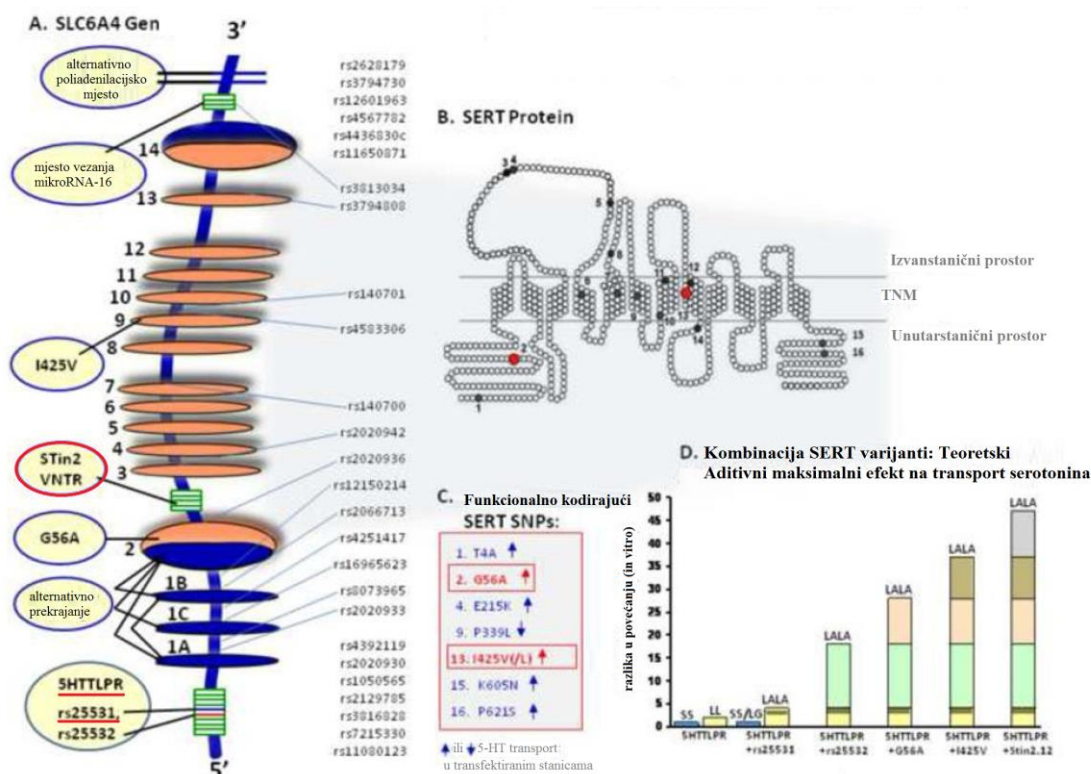
intronu (*Stin2 VNTR*; slika 2.9) *SLC6A4* gena koji se eksprimira u trialelnom stanju kao 9 i 10 (kratki, „s“) ili 12 (dugi, „l“) alelni oblik odnosno *Stin2.9*, *Stin2.10* i *Stin2.12 VNTR* ponavljanje (296, 307, 308). Premda se intronski dijelovi gena ne transkribiraju oni mogu djelovati kao transkripcijski regulatorni elementi *SLC6A4* gena. Pri tome *Stin2.12 VNTR* pokazuje jaču pojačivačku ulogu (engl. *enhancer*) od svojih kraćih (*Stin2.9*, *Stin2.10*) alelnih varijanti (307).

Transkripcijska aktivnost *SLC6A4* također modificira i 44-pb duga insercija/delecija u 5' uzvodnoj, promotorskoj regiji gena locirana otprilike 1.4 kb (engl. *kilobase pairs*) od startnog mjesta transkripcije, koju nazivamo SERT-vezana polimorfna regija (5-HTTLPR) (307, 308). Ova regija se najčešće, zbog 14 ili 16 ponavljanja varijabilno sačuvanih jedinica od 20–23 bp, sastoji od dugog (L) ili kratkog (S) alela (309, 310).

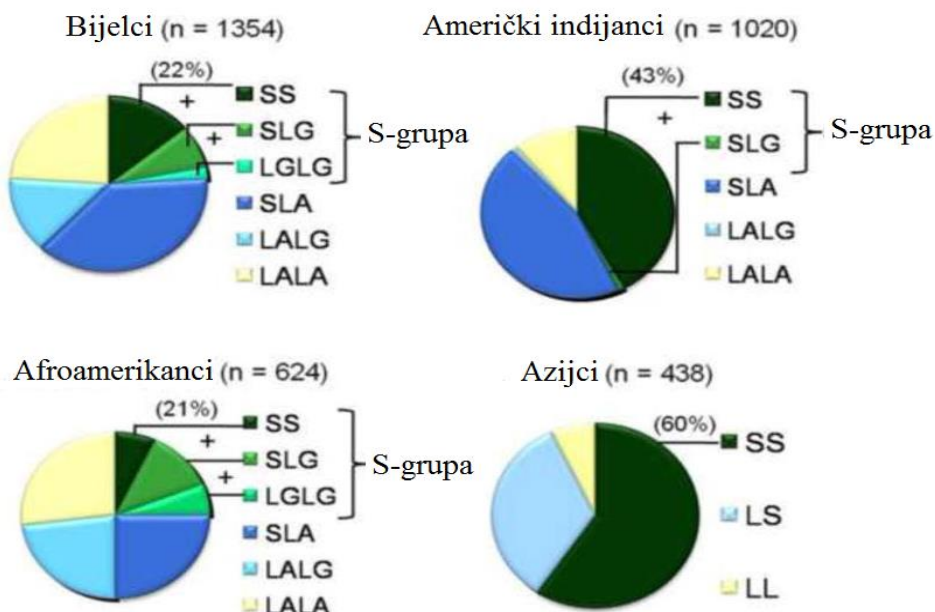
Ubrzo se uvidjelo da dugi oblik (L) inačice za insercijsko/delecijski 5-HTTLPR polimorfizam inducira i do tri puta veću transkripciju i aktivnost *SLC6A4* u odnosu na S alelnu varijantu gena (309-311). Nadalje, insercijsko/delecijski polimorfizam 5-HTTLPR promotorske regije *SLC6A4* gena funkcionalno je povezano sa uobičajenim SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) polimorfizmom rs25531 (A/G) koji se nalazi u pozadini njegove duže (L) alelne varijante (312, 313). Pri tome je zastupljeniji alel  $L_A$  povezan sa većom aktivnošću gena, dok manje zastupljena alelna forma  $L_G$  pokazuje transkripcijsku aktivnost ekvivalentnu kratkom (S) alelu 5-HTTLPR polimorfne regije (311, 314-318).

Pokazalo se i da  $L_G$  alel sadrži mjesto vezanja transkripcijskog faktora AP2 (engl. *activator protein 2*) koje djeluje represivno na promotorsku aktivnost *SLC6A4* gena (319). Stoga se interakcijom 5-HTTLPR polimorfne regije sa rs25531 SNP polimorfizmom značajna frakcija L alela pretvara u nisko ekspimirajuću alelnu formu (319). Sveukupno gledano, rs25531 SNP modifikacija 5-HTTLPR promotorske regije rezultira nastankom šest mogućih genotipskih kombinacija (S/S,  $L_G/L_G$ , S/ $L_G$ ,  $L_A/L_G$ , S/ $L_A$ , i  $L_A/L_A$ ) koje se mogu nadalje grupirati u tri skupine odnosno na skupinu sa visokom ( $L'/L' = L_A/L_A$ ), intermediajarnom ( $L'/S' = L_A/S + L_A/L_G$ ) i niskom ( $S'/S' = L_G/L_G + SS + L_G/S$ ) transkripcijskom efikasnošću *SLC6A4* gena (319).





**Slika 1.39 Organizacija humanog SERT (SLC6A4) gena i proteina uz prikaz različitih funkcionalnih varijanti.** Modificirano prema: Murphy DL, Moya PR. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(1):3-10., (297).



**Slika 1.40 Distribucija (5) varijanti SLC6A4 gena u različitim etničkim skupinama.** Modificirano prema: Murphy DL, Moya PR. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(1):3-10., (297).

Ekspresija SERT proteina dokumentirana je u centralnom živčanom sustavu različitih vrsta sisavaca dok je inicijalna detekcija SERT proteina u gastrointestinalnom sustavu zabilježena kod štakora i zamoraca (320-326).

Osim toga, ekspresija SERT proteina detektirana je i u gastrointestinalnom sustavu čovjeka i to uglavnom u epitelnim stanicama duodenuma i ileuma s tim da je njegova veća gustoća zabilježena u tankom crijevu, a ekspresija je zabilježena i u uzorcima bioptata rektuma (273, 294, 327-329).

Otprilike u isto vrijeme pokazalo se da TNBS dovodi do alteracije u ekspresiji i funkciji SERT proteina u animalnom modelu kolitisa a promjene u njegovoj ekspresiji na mRNA i proteinskom nivou zabilježene su i kod upalnih bolesti crijeva (UC i CD) i humanim *in vitro* kulturama epitelnih stanica gastrointestinalnog sustava (216, 228, 233, 236, 237, 241, 262, 273, 274, 278, 281, 283, 285, 290, 299, 331).

S obzirom na utjecaj polimorfnih varijanti SLC6A4 gena na ekspresiju i funkciju SERT proteina u gastrointestinalnom sustavu većina do sada objavljenih studija bila je usmjerena na njihovu ulogu u kliničkoj manifestaciji iritabilnog sindroma crijeva (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*) (332-344).

Nasuprot tome samo jedna do sada objavljena studija istraživala je učinak *SERT/SLC6A4* kod pacijenata sa upalnim bolestima crijeva otkrivši pri tome potencijalnu povezanost 5-HTTLPR polimorfne promotorske regije SERT/SLC6A4 gena sa pojavnošću ulceroznog kolitisa i mikrokolitisa (MC) (279, 280).

Međutim, distribucija ostalih promotorskih ili intronskih polimorfnih varijanti *SERT/SLC6A4* gena u bolesnika s UC i MC još uvijek nije poznata.

Osim toga niti jedna od trenutno poznatih varijanti SERT/SLC6A4 gena nije ispitivana u bolesnika s Crohnovom bolešću.

## **2. HIPOTEZA**

Pretpostavka ovog istraživanja je da polimorfizmi *SERT/SLC6A4* gena imaju ulogu u patogenezi Crohnove bolesti.

Polimorfizam *SERT-a*, VNTR (*Stin2*) i *SERTPR* (5-HTTLPR), povezan je sa različitim fenotipovima Crohnove bolesti.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **3.1. OPĆI CILJ:**

Glavni cilj predloženog istraživanja, koji će obuhvatiti doktorski rad, je određivanje učestalosti alelnih varijanata polimorfizama SERT-a u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti te u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika odgovarajuće dobi i spola.

### **3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. određivanje razlike učestalosti alelnih varijanata polimorfizama SERT-a u skupini ispitanika s upalnim bolestima crijeva i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika odgovarajuće dobi i spola
2. određivanje povezanosti između alelnih varijanata polimorfizma i fenotipa bolesti u ispitanika s Crohnovom bolesti
3. istražiti povezanost između genotipskih varijanata i fenotipskih karakteristika bolesnika s Crohnovom bolesti.



## **4. MATERIJALI I METODE**

#### **4.1. ISPITANICI**

Istraživanjem su obuhvaćena ukupno 192 uzastopna pacijenta sa Crohnovom bolešću dijagnosticirana u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u period od prosinca 2012 do prosinca 2016 godine.

***CD pacijenti*** - Dijagnoza Crohnove bolesti postavljena je na temelju standardnih endoskopskih, radioloških i histopatoloških kriterija (6, 8), a s obzirom na Montrealsku klasifikaciju Crohnove bolesti pacijenti su grupirani u tri skupine:

***(A) Prema životnoj dobi pri dijagnozi bolesti:***

- 1) A1  $\leq 16$
- 2) A2 17-41
- 3) A3  $>41$

***(L) Prema lokalizaciji upalnog procesa:***

- 1) L1 ukoliko bolest zahvaća terminalni ileum
- 2) L2 ukoliko bolest zahvaća kolon
- 3) L3 ukoliko bolest zahvaća Ileokolon
- 4) L4 ukoliko postoji izolirana zahvaćenost gornjeg probavnog trakta te u skupinu
- 5) bez zahvaćenost gornjeg probavnog trakta

***(B) Prema ponašanje bolesti:***

- 1) B1 ukoliko je bolest inflamatornog fenotipa,
- 2) B2 ukoliko je bolest strikturirajućeg fenotipa
- 3) B3 u slučaju penetrantnog fenotipa bolesti.

Kako je u sve tri fenotipske skupine (inflamatorni, penetrirajući i strukturirajući fenotip) s obzirom na ponašanje bolesti moguća prisutnost perianalne bolesti pacijenti su dodatno podijeljeni u dvije skupine s obzirom na

- prisutnost odnosno odsutnost perianalne bolesti.

Osim toga pacijenti sa Crohnovom bolesti podijeljeni su u binarne skupine i s obzirom na:

- prisutnost odnosno odsutnost ekstraintestinalnih manifestacija bolesti,
- postojanje odnosno odsutnost pozitivne obiteljsku anamnezu te
- podvrgnutost operacijskom zahvatu.

**Kriterij isključenja:** Bolesnici s neklasificiranom upalnom bolesti crijeva (IBDU) isključeni su iz istraživanja.

**Kontrolna skupina ispitanika** - Kontrolna skupina (HC) ispitanika sastojala se od 157 genetski nepovezanih dobrovoljnih, zdravih ispitanika bez simptoma ili pozitivne obiteljske anamneze za upalnu bolest crijeva.

Ispitanici u kontrolnoj skupini izabrani su iz skupine od 2017 dobrovoljnih sudionika (zaposlenici bolnice i/ili njihovi poznanici) tako da prema dobi i spolu odgovaraju ispitanicima s upalnom bolesti crijeva [dobrovoljni sudionici bitno mlađi ili stariji od skupine CD pacijenata bili su isključeni iz daljnjeg analiza].

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u ovom istraživanju i za prezentiranje podataka u ovom rukopisu, a protokol studije odobrio je lokalno etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (broj odobrenja 04/31-JG; broj ugovora 108-1081874- 1917., datum početka 2007/01/01).

Po uključivanju u studiju u svih je ispitanika jednokratno izvađeno 10 ml krvi iz koje je učinjena izolacija DNA te potom analiza polimorfizama *SERT/SLC6A4* gena.

## 4.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Uzorci periferne venske krvi (5 ml) prikupljeni su u tubicama sa Na-EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) antikoagulansom a genomska DNA izolirana je iz leukocita periferne krvi korištenjem modificirane neenzimatske metode izoliranja (345, 346) prema slijedećoj proceduri:

### *Liziranje eritrocita*

- 1) 900 µl RBCLB (engl. *Red blood cell lysis buffer*) pufera i 50 µl 1x Triton-X dodano je eppendorf tubicu (1.5 ml) sa 300 µl pune krvi
- 2) Inkubacija na 37<sup>0</sup>C kroz 5 minuta- liziranje crvenih krvnih stanica.
- 3) Centrifugiranje uzorka na 8000 rpm (/engl. *rounds per minute*) kroz 3 minute
- 4) Odbacivanje supernatanta

Korak 3 i 4 ponovljeni su 4-5 puta odnosno do kompletne lize eritrocita i pojave pročišćenog, bijelog taloga leukocita

### *Liziranje bijelih krvnih stanica*

- 1) Na pročišćeni talog leukocita dodano je 300 µl WBCLB (engl. *white blood cell lysis buffer*) pufera i 40 µl 10% SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*), uzorak je vorteksiran i inkubiran na 37<sup>0</sup>C kroz 5 minuta
- 2) Na kraju inkubacije dodano je 100 µl 6M NaCl, uzorak je vorteksiran kako bi došlo do precipitacije proteina.
- 3) Centrifugiranje uzorka na 8000 rpm kroz 5 minuta.

### *Precipitacija DNA*

- 1) Supernatant je prenesen u novu eppendorf tubicu (1.5 ml) uz dodatak 300 µl of izopropanola.
- 2) Precipitacija DNA je izvršena laganom inverzijom eppendorf tubice.
- 3) Uzorak je centrifugiran na 8000 rpm kroz 10 minuta-DNA ostaje u talogu.

- 4) Odbačen je supernatant, a u tubicu je dodan 70% etanol nakon čega je uzorak lagano promiješan inverzijom tubice da se uklone ostaci soli.
- 5) Uzorak je centrifugiran na 8000 rpm kroz 10 minuta-DNA ostaje u talogu.
- 6) Odbačen je supernatant, a dobivena genomska DNA osušena na zraku.
- 7) Nakon sušenja DNA u tubicu je dodano je 50  $\mu$ l TE pufera.
- 8) Nakon vorteksiranja otopine DNA, izmjerena je koncentracija i čistoća genomske DNA korištenjem spektrofotometra.

**Korištena oprema i reagensi:**

**RBCLB (500 ml):** 0.605 g TrisHCl (10mM) pH 7.6, 0.372 g KCl (10 mM), 1.016 g MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 0.372g of EDTA (2mM) otopljeno u 500ml RNAza/DNAza čistoj vodi

**Triton-X (10ml):** 0.1 ml 100 % Triton-X dodano u 9.9 ml RNAza/DNAza čistoj vodi

**WBCLB (100 ml):** 0.121 g TrisHCl (10mM) pH 7.6, 0.074 g KCl (10 mM), 1.203 g MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 0.074 g EDTA (2mM), 0.467 g of NaCl (0.4 M) otopljeno u 100ml RNAza/DNAza čistoj vodi.

**10% SDS:** 1g SDS-a otopljeno u 10ml RNAza/DNAza čistoj vodi.

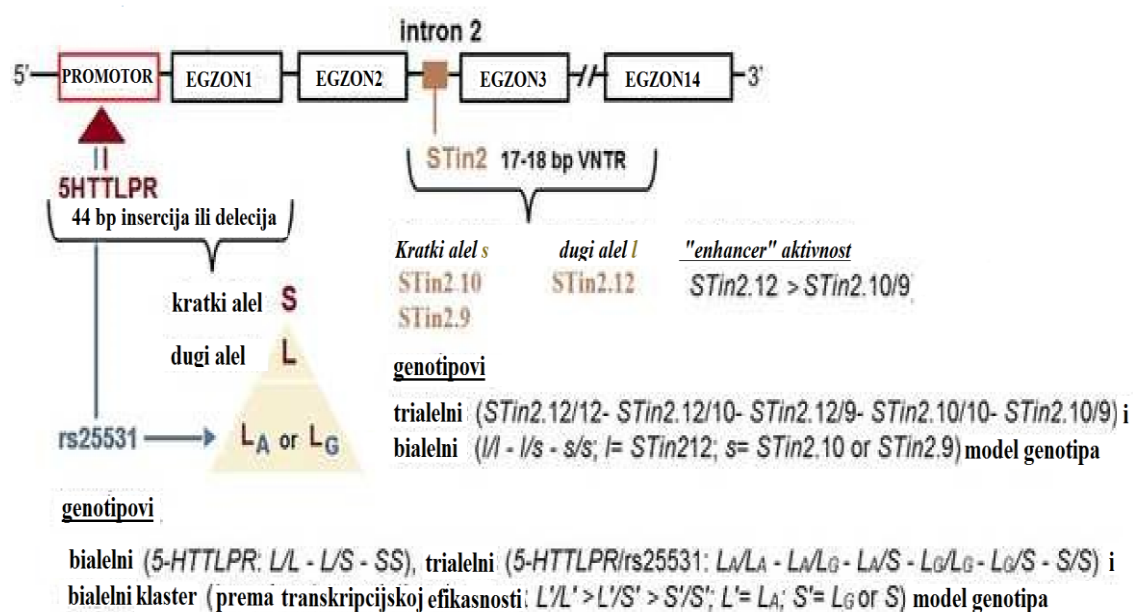
**6M NaCl:** 8.765 g NaCl otopljeno u 25 ml RNAza/DNAza čistoj vodi.

**TE pufer:** 0.030 g TrisHCl (10mM) pH 8.0, 0.009 g EDTA (1mM) otopljeno u 100ml RNAza/DNAza čistoj vodi.

**Oprema:** centrifuga, pipetori, termomikser za inkubaciju uzoraka, automatske pipete 1-100  $\mu$ L, nastavci za automatske pipete 1-100  $\mu$ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

### 4.3. GENOTIPIZACIJA SERT/SLC6A4 POLIMORFIZMA

Svi CD pacijenti (n = 192) i zdravi kontrolni ispitanici (n = 157) uključeni u studiju genotipizirani su s obzirom na promotorsku (5-HTTLPR i rs25531) i Stin2 polimorfnu regiju SERT/SLC6A4 gena (slika 4.1) primjenom metode opisane u literaturi (348-350).



**Slika 4.1 Položaj polimorfne regije SLC6A4 gena i njihove kombinacije genotipa ispitane u ovom istraživanju.** Na aktivnost SLC6A4 gena utječe insercijska/delecijska polimorfna regija 5-HTTLPR smještena u promotoru gena koja rezultira sa dva alela: dugim L i kratkim S alelnim oblikom. Ovo promotorsko područje također se funkcionalno sparuje s SNP polimorfizmom rs25531 (A / G) (SNP) koji rezultira alelima L<sub>A</sub> i L<sub>G</sub>. Alel L<sub>A</sub> povezan je s višom transkripcijskom aktivnošću, dok L<sub>G</sub> alel pokazuje niži unos serotonina i transkripcijsku aktivnost ekvivalentnu kratkom (S) alelu 5-HTTLPR polimorfne regije. Transkripcijska aktivnost gena SLC6A4 nadalje se modulira pojačivačkom (engl. enhancer) aktivnošću STin2 polimorfne regije- 17–18 bp dugog VNTR-a (engl. variable number of tandem repeats) pronađenog u intronu 2 SLC6A4 gena. Alelni oblici Stin2 VNTR polimorfne regije od 10 i 12 ponavljanja detektirane su u svim etničkim skupinama dok je alel od 9 ponavljanja pronađen samo kod osoba europskog odnosno afričkog porijekla. Prema svemu navedenom promotorska polimorfna regija može biti predstavljena u bialelnom, trialelnom i bialelnom klaster modelu genotipa dok se Stin2 VNTR polimorfna regija može predstaviti u trialelnom i bialelnom genotipskom modelu. Na slici nisu prikazani rijetki alelni oblici (npr. XL ili STin2.7) koji se nisu detektirani ovim istraživanjem. Modificirano prema: Grubelić RK et al. Association of polymorphic variants in serotonin re-uptake transporter gene with Crohn's disease: a retrospective case-control study. Croat Med J. 2018;59(5):232-243., (351).

Diskriminacija bialelnih 5-HTTLPR varijanti izvršena je primjenom modificirane metode opisane u literaturi (348-350). Pri tome su korišteni sljedeće početnice

- F (engl. forward): 5'-ATG CCA GCA CCT AAC CCC TAA TGT-3'
- R (engl. reverse): 5'-GGA CCG CAA GGT GGG CGG GA-3'

Daljnja podjela promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije na funkcionalne varijante (*S*, *LA*, *LG*) pomoću rs25531 (A/G) SNP polimorfizma izvršena je primjenom TaqMan qPCR procedure slijedeći parametre Hu XZ i suradnika (319).

Umnažanje je izvršeno primjenom 7500 qRT-PCR (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*) sistema prema slijedećim parametrima:

- 50 °C 2 minute,
- 95 °C 15 sekundi i
- 62.50 °C 1 minutu i 30 sekundi.

Kontrolni uzorci potvrđeni su sekvenciranjem genotipa (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Diskriminacija *STin2* polimorfne regije izvršena je primjenom metode opisane od strane Ito K i suradnika (352) korištenjem slijedećih početnica:

- F (engl. forward): 5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3',
- R (engl. reverse): 5'-TG TTCCTAGTCTTACGCCAGTG-3'.

Korišteni su slijedeći parametri PCR reakcije:

- inicijalna denaturacija 5 minuta na 94 °C
- 35 ciklusa od: 30 sekundi na 94 °C; 20 sekundi na 60 °C; 1 minutu na 72 °C;
- finalna ekstenzija amplicona 5 minuta na 72 °C

Dobiveni PCR ampliconi razdvojeni su elektroforezom u 3% agaroznom gelu.

Pri tome su dugi (12 ponavljanja) i kratki (10 ili 9 ponavljanja) *Stin2* VNTR aleli prezentirani kao 300 bp te 267 bp ili 250 bp dugi ampliconi (pruge u agaroznom gelu).



#### 4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka izvršena je korištenjem SPSS 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statističkog programa.

Parametrijska/neparametrijska raspodjela varijabli ispitana je primjenom Shapiro-Wilk testa.

Usporedba grupa izvršena je primjenom t testa za parametrijske (normalna raspodjela) odnosno Mann-Whitney testa za neparametrijske podatke te primjenom hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa za kategorijske varijable.

Ispitivanje razdiobe genotipova prema Hardy–Weinberg ravnoteži izvršeno je primjenom tzv. „goodness of fit”  $\chi^2$  testa dok je razlika u distribuciji alela ispitana primjenom  $\chi^2$  odnosno Fisherovog egzaktnog testa.

Analiza asocijacije između CD i genotipskih varijanti *SLC6A4* gena promotorske (5-HTTLPR i rs25531) i intronske (*Stin2* VNTR) polimorfne regije ispitana je analizom neprilagođenog (engl. crude) i prilagođenog (s obzirom na spol i starost) omjera izgleda (OR, engl. *odds ratio*) i pripadajućeg 95% interval pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*) koji su određeni metodom binarne logističke regresije.

Na isti način je provedena asocijacijska analiza s obzirom na spol pacijenta te kliničke podtipove Crohnove bolesti (primjerice dob pri dijagnozi, lokalizacija oboljenja i ponašanje bolesti).

S obzirom da  $L_G$  alel ima istu transkripcijsku aktivnost kao i S alel analiza 5-HTTLPR-rs25531 genotipova provedena je i s obzirom na njihovu bialelnu klaster formu (L'L', L'S' i S'S'; L'= LA; S'= LG or S; Slika 4.1).

Slično tome, da bi se odredilo koji pristup bolje ukazuje na povezanost varijabilnosti *STin2* VNTR-a sa pojavom Crohnove bolesti ovaj polimorfni lokus analiziran je u trialelnoj (*STin2.12/12* - *STin2.12/10* - *STin2.12/9* - *STin210/10* - *STin2.10/9*) i bialelnoj (ll - ls - ss; Slika 4.1) genotipskoj formi.

Sve bialelne genotipske forme (Slika 4.1):

- **5-HTTLPR**:  $L/L - L/S - SS$ ;
- **rs25531**:  $L_A/L_A - L_A/L_G - L_A/S - L_G/L_G - L_G/S - S/S$ ;
- **5-HTTLPR-rs25531**:  $L'L', L'S' i S'S' te$
- **Stin2 VNTR**:  $l/l - l/s - s/s$ ;  $l = STin212$ ;  $s = STin2.10$  or  $STin2.9$

analizirane su prema kodominantnom, dominantnom i recesivnom genetičkom modelu uporabom SNPStats programa (<https://snpstats.net/>) (352).

Konstrukcija haplotipova, analiza neravnoteže vezanja (LD-a engl. *linkage disequilibrium*) i asocijacijska analiza haplotipova provedeni su uporabom SHEsisPlus programa (<http://shesisplus.bio-x.cn/SHEsis.html>) (353).

Snaga testa (engl. *power of analysis*; za izračunavanje veličine uzorka i post-hoc snage studije) ispitana je primjenom G\*Power programa (verzija 3.1.9.2 Windows) (354).

Za analizu frekvencija 5-HTTLPR genotipa s  $\chi^2$  testom [s malom efektivnom veličinom ( $w = 0,2$ , df (engl. *degrees of freedom*) = 2); snaga ( $1-\beta$ ) = 0,80 i  $\alpha = 0,017$  (Bonferroni korigirana P vrijednost)] potrebna ukupna veličina uzorka je 313, a stvarna veličina uzorka je 349.

Post-hoc izračunata snaga testa ( $1-\beta$ ) iznosila je 0,085 ( $w = 0,2$ ), 0,997 ( $w = 0,3$ ; srednje učinkovita veličina), i 1,00 ( $w = 0,5$ ; velika efektivna veličina) za raspodjelu genotipa i 0,80 za analizu frekvencije alela ( $w = 0,2 - 0,5$ ; df = 1).

Za *a priory* analizu frekvencija genotipa STin2 VNTR polimorfnog lokusa s  $\chi^2$  testom [s malom efektivnom veličinom ( $w = 0,23$ , df = 4); snaga ( $1-\beta$ ) = 0,80 i  $\alpha = 0,008$  (Bonferroni korigirana P vrijednost)] potrebna ukupna veličina uzorka je 329, a postignuta post-hoc snaga ( $1-\beta$ ) analize bila je 0,83 - 1,00 za raspodjelu genotipa i 0,99 - 1,00 ( $w = 0,2 - 0,5$ ; df = 2) za analizu frekvencije alela.

Nadalje, sa snagom testa od 0,80 uspješni smo otkriti veličinu učinka od 0,223 za značajnu razliku u frekvencijama genotipa STin2 VNTR polimorfnog lokusa.

Rezultati provedenih statističkih analiza izraženi su (ukoliko se drugačije ne navede) kao medijan i IQR (engl. *interquartile range*), OR + 95% CI te broj (n) i % ispitanika uključenih u analizu.

$P < 0.05$  je odabran kao mjera signifikantnosti, a korekcija za višestruke usporedbe izvršena je uporabom Bonferroni procedure (korigirani nivo signifikantnosti:  $p_c = 0.05/N$ ; N – broj neovisnih testova).

Sve P vrijednosti prikazane u rezultatima (ukoliko se drugačije ne navede) su nekorigirane.

## **5. REZULTATI**

## 5.1. OSNOVNE KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U istraživanje je uključeno 192 bolesnika s Crohnovom bolesti čije su osnovne kliničke karakteristike prikazane u tablici 5.1.

U skupini bolesnika s Crohnovom bolesti bilo je 104 (54.2%) muškaraca, a medijan dobi prilikom postavljanja dijagnoze iznosio je 25 godina s interkvartilnim rasponom od 19.0 - 31.0 godinu.

Najčešća lokalizacija bolesti bio je ileokolitis (47.4%), dok oko trećina bolesnika ima zahvaćen samo terminalni ileum (31.3%), a 17.7% ima izoliranu zahvaćenost kolona.

Također, s obzirom na ponašanje bolesti, najveći broj bolesnika ima inflamatorni fenotip (46.4%) Crohnove bolesti nakon čega slijede bolesnici s strikturirajućim (33.3%) i penetrantnim fenotipom (20.3%) bolesti.

Od ukupnog broja bolesnika prisutnost perianalne bolesti zabilježena je u oko trećine bolesnika (32.8%) dok su ekstraintestinalne manifestacije bolesti zabilježene u 22.4% bolesnika.

Pozitivna obiteljska anamneza zabilježena je kod svega 8.85% bolesnika dok je više od polovice pacijenata podvrgnut operacijskom zahvatu (54.69%).

Kliničke karakteristike bolesnika odraz su činjenice da su regrutirani u tercijarnom centru zbog čega je vidljiv znatan broj bolesnika s ekstenzivnom bolešću kao i visok postotak operiranih bolesnika.

U kontrolnu skupinu uključeno je 157 zdravih ispitanika bez simptoma ili pozitivne obiteljske anamneze za upalnu bolest crijeva.

Ispitanici u kontrolnoj skupini izabrani su tako da prema dobi i spolu odgovaraju ispitanicima s upalnom bolesti crijeva [Spol - CD: 88 (45.8%) žena i 104 (54.2%) muškarca; HC: 84 (53.5%) žene, 73 (46.5%) muškarca; Pearson Hi-kvadrat test:  $\chi^2=2.033$ ,  $P = 0.154$ ]; Dob (srednja vrijednost  $\pm$  SD) - CD:  $41.34\pm 12.789$ ; HC:  $41.68\pm 8.789$ ; Mann-Whitney test,  $P = 0.091$  ].

**Tablica 5.1 Glavne kliničke karakteristike pacijenata obuhvaćenih studijom**

Varijabla	Ukupno n (%)	Žene n (%)	Muškarci n (%)
<b>Dob pri dijagnozi:</b>			
1. A1 ≤ 16	21 (10.93)	5 (23.8)	16 (76.2)
2. A2 17-41	153 (79.69)	76 (49.7)	77 (50.3)
3. A3 >41	18 (9.38)	7 (38.9)	11 (61.1)
<b>Lokalizacija bolesti</b>			
1. L1 Ileum	60 (31.3)	29 (48.3)	31 (51.7)
2. L2 Kolon	34 (17.7)	14 (41.2)	20 (58.8)
3. L3 Ileokolon	91 (47.4)	41 (45.1)	50 (54.9)
4. L4 Gornji probavni sustav	29 (15.1)	17 (58.6)	12 (41.4)
5. Bez zahvaćenosti gornjeg probavnog sustava	157 (81.8)	68 (43.3)	89 (56.7)
<b>Ponašanje bolesti</b>			
1. B1 Inflamatorno	89 (46.4)	40 (44.9)	49 (55.1)
2. B2 Strikturirajuće	64 (33.3)	31(48.4)	33 (51.6)
3. B3 Penetrirajuće	39 (20.3)	17(43.6)	22 (56.4)
<b>Perianalna bolest</b>			
Da	63 (32.8)	24 (38.1)	39 (61.9)
Ne	129 (67.2)	64(49.6)	65 (50.4)
<b>Ekstraintestinalne manifestacije</b>			
Da	43 (22.4)	23 (53.5)	20 (44.7)
Ne	134 (69.8)	57 (42.54)	77 (57.46)
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>			
Da	17 (8.85)	8 (47.1)	9 (52.9)
Ne	175 (91.15)	80 (45.71)	95 (54.29)
<b>Operativni zahvat</b>			
Da	105 (54.69)	45 (42.9)	60 (57.1)
Ne	87 (45.31)	43 (49.4)	44 (50.6)

*n* - broj ispitanika

## 5.2. Povezanost 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena i Crohnove bolesti

Analizom distribucije genotipova 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena u skupini CD pacijenata, kontrolnoj skupini te cjelokupnom uzorku svih ispitanika nije utvrđeno statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže za niti jedan od promatranih polimorfnih lokusa (Tablica 5.2).

**Tablica 5.2. Provjera odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže**

Polimorfni lokus	$\chi^2$ CD	P Pearsonov $\chi^2$ test CD	P Fisherov egzadni test CD	$\chi^2$ Kontrolni ispitanici	P Pearsonov $\chi^2$ test Kontrolni ispitanici	P Fisherov egzadni test Kontrolni ispitanici	$\chi^2$ Svi ispitanici	P Pearsonov $\chi^2$ test Svi ispitanici	P Fisherov egzadni test Svi ispitanici
5-HTTLPR*	0.557	0.756	0.903	0.156	0.924	0.935	0.058	0.971	0.982
rs25531 <sup>#</sup>	1.151	0.949	0.984	2.358	0.797	NP	0.943	0.966	NP
STin2 VNTR <sup>#</sup>	0.585	0.964	1	7.224	0.124	NP	3.923	0.416	NP

CD – Crohnova bolest; \*  $df=1$ ; <sup>#</sup>  $df=3$ ; NP- nije primjenjivo

Osim toga, frekvencija alela i genotipova svih ispitanih polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena u skladu je sa prethodno objavljenim podacima za Hrvatsku i druge Europske populacije stanovništva (304-307, 355-357).

Usporedbom CD i HC grupe ispitanika uočena je statistički značajna razlika uz distribuciji STin2 alela koja je ostala signifikantna i nakon primjene Bonferroni korekcije ( $P_c = 0.05/3 = 0.017$ ) (Tablica 5.3).

Isti slučaj opažen je i kod usporedbe ženske podskupine CD pacijenata ( $\chi^2= 9.85$ ,  $df= 2$ ,  $P = 0.007$ ) i odgovarajuće HC podskupine ispitanika (Tablica 5.4).

Osim toga za STin2.12 alel uočena je pozitivna, a za STin 2.9 alel negativna povezanost sa pojavom Crohnove bolesti u slučaju usporedbe sveukupne skupine CD i HC ispitanika (Tablica 5.3) kao i u slučaju usporedbe odgovarajućih ženskih podskupina CD i HC skupine ispitanika (Tablica 5.4).



No u ovom slučaju statistički značajna razlika nakon Bonferroni korekcije ( $P_c = 0.05/3 = 0.017$ ) uočena je samo u slučaju *Stin2.9* alela (Tablica 5.3 i 5.4).

**Tablica 5.3 Distribucija 5-HTTLPR, *STin2* VNTR i rs25531 SNP alela u cjelokupnoj CD i HC grupi ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test		Individualna usporedba		
	n	%	n	%	$\chi^2$	p	$\chi^2$	$P^\ddagger$	OR (95% CI) <sup>‡</sup>
<i>5-HTTLPR</i>									
<i>L</i>	231	60.2	208	66.24	2.74	0.098	2.74	0.098	0.77 (0.56-1.05)
<i>S</i>	153	39.8	106	33.76			2.74	0.098	1.30 (0.95-1.77)
<i>rs25531</i>									
<i>L<sub>A</sub></i>	212	55.21	185	58.92	3.76	0.152	0.97	0.325	0.86 (0.64-1.16)
<i>L<sub>G</sub></i>	19	4.95	23	7.32			1.73	0.188	0.66 (0.35-1.23)
<i>S</i>	153	39.84	106	33.76			2.74	0.097	1.30 (0.95-1.77)
<i>STin2 VNTR</i>									
12	242	63.0	174	55.41	12.03	<b>0.002**</b>	4.15	0.042	1.37 (1.01-1.86)
10	141	36.7	130	41.40			1.59	0.207	0.82 (0.61-1.12)
9	1	0.3	10	3.19					0.08 (0.01-0.62)
								<b>0.002**</b>	

*CD* - Crohnova bolest; *5-HTTLPR* - engl. serotonin reuptake transporter (*SLC6A4*) length polymorphic region; *STin2 VNTR* - engl. variable number of tandem repeats (*VNTR*) - u intron 2 *SLC6A4* gena; *rs25531* - engl. single nucleotide (*SNP*) polymorphism; lociran u duljoj varijanti *5-HTTLPR* alela; *L* – Dugi *5-HTTLPR* alel; *S* – Kratki *5-HTTLPR* alel; *L<sub>A</sub>* – Dugi *5-HTTLPR* alel- povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću *SLC6A4* gena; *L<sub>G</sub>* – Dugi *5-HTTLPR* alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost *SLC6A4* gena – ekvivalentno kratkom (*S*) alelu promotorske *5-HTTLPR* polimorfne regije *SLC6A4* gena; 12, 10, 9: *STin2 VNTR* aleli; *NP* - nije primjenjivo; *OR*: engl. odds *CI* - engl. confidence interval;  $^\ddagger$  Neprilagođene *P* i *OR*+ 95% *CI* vrijednosti; \*\*Statistički značajne *P* vrijednosti ( $< P_c$ ); Bonferroni korekcija  $P_c = 0.05/3 = 0.017$

U slučaju usporedbe muške podskupine CD pacijenata i odgovarajuće podskupine kontrolnih ispitanika nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji alela *Stin2 VNTR* polimorfnog lokusa iako je i ovdje za *STin2.12* alel uočena je pozitivna, a za *STin2.9* alel negativna no u oba slučaja statistički nesignifikantna povezanost sa pojavom Crohnove bolesti (Tablica 5.5).

**Tablica 5.4 Distribucija 5-HTTLPR, STin2 VNTR i rs25531 SNP alela u ženskoj podskupini CD i HC ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test		Individualna usporedba		
	n	%	n	%	$\chi^2$	p	$\chi^2$	P <sup>‡</sup>	OR (95% CI) †
<i>5-HTTLPR</i>									
L	107	60.8	114	67.86	1.87	0.177	1.87	0.171	0.73 (0.47-1.14)
S	69	39.2	54	32.14			1.87	0.171	1.36 (0.95-1.77)
<i>rs25531</i>									
L <sub>A</sub>	100	56.82	100	59.53	3.98	0.137	0.26	0.61	0.90 (0.58-1.37)
L <sub>G</sub>	7	3.98	14	8.33			2.85	0.09	0.46 (0.18-1.16)
S	69	39.20	54	32.14			1.87	0.17	1.36 (0.87-2.12)
<i>STin2 VNTR</i>									
12	111	63.07	86	51.19	9.85	<b>0.007**</b>	4.96	0.026	1.63 (1.06-2.50)
10	65	36.93	76	45.24			2.45	0.120	0.71 (0.46-1.09)
9	0	0.00	6	3.57				<b>0.013**</b>	NP

CD - Crohnova bolest; 5-HTTLPR - engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 SLC6A4 gena; rs25531 - engl. single nucleotide (SNP) polymorphism; lociran u duljoj varijanti 5-HTTLPR alela; L – Dugi 5-HTTLPR alel; S – Kratki 5-HTTLPR alel; L<sub>A</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel- povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću SLC6A4 gena; L<sub>G</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost SLC6A4 gena – ekvivalentno kratkom (S) alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije SLC6A4 gena; 12, 10, 9: STin2 VNTR aleli; NP - nije primjenjivo; OR: engl. odds CI- engl. confidence interval; † Neprilagođene P i OR+ 95% CI vrijednosti; \*\*Statistički značajne P vrijednosti (< P<sub>c</sub>); Bonferroni korekcija P<sub>c</sub> = 0.05/3 = 0.017

S obzirom na frekvenciju alela 5-HTTLPR i rs25531 SNP polimorfne regije SLC6A4 gena nije uočena statistički značajna razlika ni prilikom usporedbe cjelokupne CD skupine i kontrolnih ispitanika (tablica 5.3) kao ni prilikom usporedbe odgovarajućih podskupina pacijenata i kontrolnih ispitanika podijeljenih po spolu (Tablica 5.4 i 5.5)

No unatoč tome vidljiva je pozitivna, premda statistički nesignifikantna, povezanost kratkog (S) alela 5-HTTLPR i rs25531 polimorfne regije SLC6A4 gena sa pojavnošću Crohnove bolesti (Tablica 5.3, 5.4 i 5.5).

**Tablica 5.5 Distribucija 5-HTTLPR, STin2 VNTR i rs25531 SNP alela u muškoj podskupini CD i HC ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test		Individualna usporedba		
	n	%	n	%	$\chi^2$	p	$\chi^2$	$P^\ddagger$	OR (95% CI) <sup>‡</sup>
<i>5-HTTLPR</i>									
<i>L</i>	124	59.62	94	64.38	0.82	0.365	0.82	0.365	0.82 (0.53-1.26)
<i>S</i>	84	40.38	52	35.62			0.82	0.365	1.22 (0.79-1.90)
<i>rs25531</i>									
<i>L<sub>A</sub></i>	112	53.85	85	58.22	0.83	0.661	0.66	0.417	0.84 (0.55-1.28)
<i>L<sub>G</sub></i>	12	5.77	9	6.16			0.02	0.888	0.93 (0.38-2.27)
<i>S</i>	84	40.38	52	35.62			0.82	0.365	1.22 (0.79-1.90)
<i>STin2 VNTR</i>									
<i>12</i>	131	62.98	88	60.27	3.206	0.071	0.27	0.603	1.12 (0.73-1.73)
<i>10</i>	76	36.54	54	36.99			0.01	0.920	0.98 (0.63-1.52)
<i>9</i>	1	0.48	4	2.74				0.164	0.17(0.02-1.55)

CD - Crohnova bolest; 5-HTTLPR - engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 SLC6A4 gena; rs25531 - engl. single nucleotide (SNP) polymorphism; lociran u duljoj varijanti 5-HTTLPR alela; *L* – Dugi 5-HTTLPR alel; *S* – Kratki 5-HTTLPR alel; *L<sub>A</sub>* – Dugi 5-HTTLPR alel- povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću SLC6A4 gena; *L<sub>G</sub>* – Dugi 5-HTTLPR alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost SLC6A4 gena – ekvivalentno kratkom (*S*) alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije SLC6A4 gena; 12, 10, 9: STin2 VNTR aleli; NP nije primjenjivo; OR: engl. odds CI- engl. confidence interval; ‡ Neprilagođene P i OR+ 95% CI vrijednosti; \*\*Statistički značajne P vrijednosti (< P<sub>c</sub>); Bonferroni korekcija P<sub>c</sub> = 0.05/3 = 0.017

Pearsonov  $\chi^2$  test pokazao je statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova STin2 VNTR polimorfne regije SLC6A4 gena između CD i kontrolne skupine ispitanika (P = 0.002) te između ženske podskupine CD pacijenata i odgovarajuće podskupine kontrolnih ispitanika (Tablica 5.6 i 5.7). To je još više došlo do izražaja u kad su nosioci rijetkih STin2 genotipova (STin2 12/9 + STin2 10/9; CD vs. HC: Fisherov egzaktni test Test; P = 0.002) grupirani u jednu zajedničku podskupinu (cijelokupna CD skupina:  $\chi^2 = 15.720$ , df = 3, P = 0.001; ženska podskupina:  $\chi^2 = 15.326$ , df = 3, P = 0.002). Osim toga među CD pacijentima uočena je znatno češća prisutnost STin2 12/12 i STin2 12/10 genotipova te

znatno manja prisutnost *STin2 10/10* genotipa u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Isti fenomen uočen je i prilikom usporedbe ženskih podskupina CD i kontrolne skupine ispitanika. Nasuprot tome kod usporedbe muške podskupine CD pacijenata i odgovarajuće kontrolnih ispitanika nisu zabilježene statistički značajne razlike u distribuciji *STin2* genotipova (Tablica 5.8). No ovdje treba naglasiti činjenicu da usprkos znatno liberalnoj primjeni Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c = 0.05/N = 0.008$ ;  $N = 6$  – broj analiziranih genotipova) nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji individualnih *STin2 VNTR* genotipova *SLC6A4* gena između CD i kontrolne skupine ispitanika.

Logistička regresija kodominantnog trialelnog *STin2* genotipskog modela također nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji individualnih genotipova između CD i kontrolne skupine ispitanika (Tablica 5.9). No, analiza recesivnog bialelnog *STin2* modela kao i istovjetna analiza ženske podskupine ispitanika (CD vs. kontrolna skupina) pokazala je statistički značajnu negativnu povezanost bialelnog *ss* ( $s = STin2.10$  ili  $STin2.9$ ) *STin2 VNTR* genotipa sa pojavnošću Crohnove bolesti u usporedbi sa nosiocima *ll* i *ls* genotipa (Tablica 5.9) koja je ostala statistički značajna i nakon unosa kovarijantne za dob i/ili spol ispitanika (ženska podskupina: Wald = 7.564, df=1, P = 0.006, OR prilagođen s obzirom na dob = 0.32, 95% CI = 0.14-0.72) (Tablica 5.10).

No unatoč tome, samo je varijacija kodominantnog *STin2* genotipskog modela u kome su rijetki genotipovi (*STin2 12/9* i *10/9*) grupirani zajedno pokazala statistički značajne globalne P vrijednosti logističke regresijske analiza i to samo prilikom analize cjelokupne (muškarci + žene) CD skupine u odnosu na kontrolne ispitanike (Tablica 5.9 i 5.10).

**Tablica 5.6 Distribucija 5-HTTLPR, STin2 VNTR i rs25531 SNP genotipova u cjelokupnoj CD i HC grupi ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test	
	n	%	n	%	$\chi^2$	p
5-HTTLPR					3.410	0.188
	L/L	67	34.90	70	44.60	
	L/S	97	50.50	68	43.30	
	S/S	28	14.60	19	12.10	
5-HTTLPR/rs25531 trialelni model					5.674	0.339
	L <sub>A</sub> /L <sub>A</sub>	57	29.70	57	36.30	
	L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub>	10	5.20	11	7.00	
	L <sub>A</sub> /S	88	45.80	60	38.20	
	L <sub>G</sub> /S	9	4.70	8	5.10	
	L <sub>G</sub> /L <sub>G</sub>	0	0.00	2	1.30	
	S/S	28	14.60	19	12.10	
5-HTTLPR/rs25531 bialelni model					1.791	0.402
	L'/L'	57	29.70	57	36.30	
	L'/S'	98	51.00	71	45.20	
	S'/S'	37	19.30	29	18.50	
STin2 VNTR trialelni model					15.857	<b>0.002**</b>
	12/12	76	39.60	55	35.00	
	12/10	89	46.40	57	36.30	
	12/9	1	0.50	7	4.50	
	10/10	26	13.50	35	22.30	
	10/9	0	0.00	3	1.90	
STin2 VNTR bialelni model					6.562	0.037
	l/l	76	39.60	55	35.00	
	l/s	90	46.90	64	40.80	
	s/s	26	13.50	38	24.20	

CD - Crohnova bolest; 5-HTTLPR - engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 SLC6A4 gena; rs25531 - engl. single nucleotide (SNP) polymorphism; lociran u duljoj varijanti 5-HTTLPR alela; L – Dugi 5-HTTLPR alel; S – Kratki 5-HTTLPR alel; L<sub>A</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel- povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću SLC6A4 gena; L<sub>G</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost SLC6A4 gena – ekvivalentno kratkom (S) alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije SLC6A4 gena; 12, 10, 9: STin2 VNTR aleli; \*\*Statistički značajne P vrijednosti (< P<sub>c</sub>); Bonferroni korekcija P<sub>c</sub> = 0.05/6 - maksimalni broj genotipova = 0.008

**Tablica 5.7 Distribucija 5-HTTLPR, STin2 VNTR i rs25531 SNP genotipova u ženskoj podskupini CD i HC ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test	
	n	%	n	%	$\chi^2$	p
5-HTTLPR					3.471	0.177
	L/L	30	34.10	40	47.60	
	L/S	47	53.40	34	40.50	
	S/S	11	12.50	10	11.90	
5-HTTLPR/rs25531 trialelni model					6.575	0.254
	L <sub>A</sub> /L <sub>A</sub>	25	28.41	32	38.10	
	L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub>	5	5.68	6	7.14	
	L <sub>A</sub> /S	45	51.14	30	35.71	
	L <sub>G</sub> /S	2	2.27	4	4.76	
	L <sub>G</sub> /L <sub>G</sub>	0	0.00	2	2.38	
	S/S	11	12.50	10	11.91	
5-HTTLPR/rs25531 bialelni model					3.358	0.192
	L'/L'	25	28.40	32	38.10	
	L'/S'	50	56.80	36	42.90	
	S'/S'	13	14.60	16	19.00	
STin2 VNTR trialelni model					15.328	<b>0.002**</b>
	12/12	33	37.50	26	31.00	
	12/10	45	51.10	29	34.50	
	12/9	0	0.00	5	6.00	
	10/10	10	11.40	23	27.40	
	10/9	0	0.00	1	1.20	
STin2 VNTR bialelni model					8.038	0.018
	l/l	33	37.50	26	31.00	
	l/s	45	51.10	34	40.50	
	s/s	10	11.40	24	28.60	

CD - Crohnova bolest; 5-HTTLPR - engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 SLC6A4 gena; rs25531 - engl. single nucleotide (SNP) polymorphism; lociran u duljoj varijanti 5-HTTLPR alela; L – Dugi 5-HTTLPR alel; S – Kratki 5-HTTLPR alel; L<sub>A</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel- povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću SLC6A4 gena; L<sub>G</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost SLC6A4 gena – ekvivalentno kratkom (S) alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije SLC6A4 gena; 12, 10, 9: STin2 VNTR aleli; \*\*Statistički značajne P vrijednosti (< P<sub>c</sub>); Bonferroni korekcija P<sub>c</sub>=0.05/6 - maksimalni broj genotipova =0.008

**Tablica 5.8 Distribucija 5-HTTLPR, STin2 VNTR i rs25531 SNP genotipova u muškoj podskupini CD i HC ispitanika**

Polimorfizam	CD		kontrola		Pearsonov $\chi^2$ test	
	n	%	n	%	$\chi^2$	p
5-HTTLPR					0.837	0.651
	L/L	37	35.60	30	41.10	
	L/S	50	48.10	34	46.60	
	S/S	17	16.30	9	12.30	
5-HTTLPR/rs25531 trialelni model					1.057	0.900
	L <sub>A</sub> /L <sub>A</sub>	32	30.77	25	34.25	
	L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub>	5	4.80	5	6.85	
	L <sub>A</sub> /S	43	41.35	30	41.09	
	L <sub>G</sub> /S	7	6.73	4	5.48	
	L <sub>G</sub> /L <sub>G</sub>	0	0.00	0	0.00	
	S/S	17	16.35	9	12.33	
5-HTTLPR/rs25531 bialelni model					0.760	0.676
	L'/L'	32	30.80	25	34.20	
	L'/S'	48	46.20	35	47.90	
	S'/S'	24	23.10	13	17.80	
STin2 VNTR trialelni model					3.872	0.460
	12/12	43	41.30	29	39.70	
	12/10	44	42.30	28	38.40	
	12/9	1	1.00	2	2.70	
	10/10	16	15.40	12	16.40	
	10/9	0	0.00	2	2.70	
STin2 VNTR bialelni model					0.440	0.808
	l/l	43	41.30	29	39.70	
	l/s	45	43.30	30	41.10	
	s/s	16	15.40	14	19.20	

CD - Crohnova bolest; HC - engl. healthy control; 5-HTTLPR - engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 SLC6A4 gena; rs25531 - engl. single nucleotide (SNP) polymorphism; lociran u duljoj varijanti 5-HTTLPR alela; L – Dugi 5-HTTLPR alel; S – Kratki 5-HTTLPR alel; L<sub>A</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel-povezan sa povećanom transkripcijskom aktivnošću SLC6A4 gena; L<sub>G</sub> – Dugi 5-HTTLPR alel – smanjeni povratni unos serotonina i slabija transkripcijska aktivnost SLC6A4 gena – ekvivalentno kratkom (S) alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije SLC6A4 gena; 12, 10, 9: STin2 VNTR aleli; \*\*Statistički značajne P vrijednosti (< P<sub>c</sub>); Bonferroni korekcija P<sub>c</sub> =0.05/6 - maksimalni broj genotipova =0.008



Tablica 5.9 Logistička regresijska analiza *STin2 VNTR* polimorfnog lokusa *SLC6A4* gena

Polimorfizam	n (%) ispitanika		Logistička regresija			
	CD	kontrola	neprilagođeni OR (95% CI)	<i>P</i> <sup>†</sup>	OR (95% CI) <sup>‡</sup>	<i>P</i> <sup>†</sup>
<b><i>STin2 VNTR</i> trialelni<sup>§</sup></b>						
Kodominantni model A				0.038 <sup>II</sup>		0.043 <sup>II</sup>
12/12	76 (39.6)	55 (35.0)	referenca 1.0		referenca 1.0	
12/10	89 (46.4)	57 (36.3)	1.13 (0.7-1.83)	0.618	1.15 (0.71-1.86)	0.570
10/10	26 (13.5)	35 (22.3)	0.54 (0.29-0.99)	0.048	0.55 (0.30-1.02)	0.056
12/9	1 (0.5)	7 (4.5)	0.10 (0.01-0.86)	0.036	0.11 (0.013-0.89)	0.040
10/9	0 (0.0)	3 (1.9)	NA	0.990	NA	0.100
Kodominantni model B <sup>¶</sup>				<b>0.008**</b>		0.009
12/12	76 (39.6)	55 (35.0)	referenca 1.0		referenca 1.0	
12/10	89 (46.4)	57 (36.3)	1.13 (0.7-1.83)	0.618	1.15 (0.71-1.86)	0.600
10/10	26 (13.5)	35 (22.3)	0.54 (0.29-0.99)	0.048	0.55 (0.3-1.02)	0.060
9/drugi	1 (0.5)	10 (6.4)	0.07 (0.01-0.58)	<b>0.014**</b>	0.073 (0.01-0.59)	<b>0.014**</b>
<b><i>STin2 VNTR</i> bialelni</b>						
Kodominantni model				0.041 <sup>II</sup>		0.045 <sup>II</sup>
1/1	76 (39.6)	55 (35.0)	2.02 (1.10-3.71)	0.023	1.98 (1.08-3.64)	0.028
1/s	90 (46.9)	64 (40.8)	2.06 (1.14-3.72)	0.017	2.05 (1.13-3.71)	0.018
s/s	26 (13.5)	38 (24.2)	referenca 1.0		referenca 1.0	
Dominantni model						
1/1	76 (39.6)	55 (35.0)	referenca 1.0		referenca 1.0	
1/s-s/s	116 (60.4)	102 (65.0)	0.82 (0.53-1.27)	0.380	0.84 (0.54-1.30)	0.400
Recesivni model						
1/1-1/s	166 (86.5)	119 (75.8)	referenca 1.0		referenca 1.0	
s/s	26 (13.5)	38 (24.2)	0.49 (0.28-0.85)	<b>0.011**</b>	0.5 (0.29-0.86)	<b>0.013**</b>

CD – Crohnova bolest; *STin2 VNTR* - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 *SLC6A4* gena;; OR – engl. odds ratio; CI – engl. confidence interval. 1 – Dugi (12) *STin2* aleli; s – kratki(10, 9) *STin2* aleli; 12, 10, 9: *STin2 VNTR* aleli. <sup>†</sup>Bonferroni nekorrigirane *P* vrijednosti. <sup>‡</sup>Logistička regresijska analiza prilagođena s obzirom na dob i spol. <sup>§</sup> Sveukupna distribucija *STin2 VNTR* genotipovi u CD i kontrolnoj skupini ispitanika:  $\chi^2 = 15.857$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.003$ .<sup>II</sup>Globalna *P* vrijednosti za logističku regresijsku analizu. <sup>¶</sup>Rijetke genotipske varijante grupirane u jednu skupinu.\*\* Statistički značajne *P* vrijednosti (<*P*<sub>c</sub>). Bonferroni korekcija za distribuciju genotipova  $P_c = 0.008$  (0.05/6 – broj genotipova) i logističku regresijsku analizu  $P_c = 0.017$  (0.05/3 – broj uspoređenih modela).

Tablica 5.10 Logistička regresijska analiza *STin2* VNTR polimorfnog lokusa *SLC6A4* gena u ženskoj skupini ispitanika

Polimorfizam	n (%) ispitanika		Logistička regresija			
	CD	kontrola	neprilagođeni OR (95% CI)	<i>P</i> <sup>†</sup>	OR (95% CI) <sup>‡</sup>	<i>P</i> <sup>†</sup>
<b><i>STin2</i> VNTR trialelni<sup>§</sup></b>						
Kodominantni model A				0.081 <sup>II</sup>		0.080 <sup>II</sup>
12/12	33 (37.50)	26 (31.00)	referenca 1.0		referenca 1.0	
12/10	45 (51.10)	29 (34.50)	1.22 (0.61-2.45)	0.570	1.22 (0.61-2.45)	0.570
10/10	10 (11.40)	23 (27.40)	0.34 (0.14-0.85)	0.020	0.34 (0.14-0.85)	0.020
12/9	0.0 (0.00)	5.0 (6.00)	NA	0.999	NA	0.999
10/9	0.0 (0.00)	1.0 (1.20)	NA	1.00	NA	1.00
Kodominantni model B <sup>¶</sup>				0.040		0.040
12/12	33 (37.50)	26 (31.00)	referenca 1.0		referenca 1.0	
12/10	45 (51.10)	29 (34.50)	1.22 (0.61-2.45)	0.570	1.22 (0.61-2.45)	0.570
10/10	10 (11.40)	23 (27.40)	0.34 (0.14-0.85)	0.020	0.34 (0.14-0.85)	0.020
9/drugi	0(0.00)	6 (7.10)	NA	0.999	NA	0.999
<b><i>STin2</i> VNTR bialelni</b>						
Kodominantni model				0.023 <sup>II</sup>		0.023 <sup>II</sup>
l/l	33 (37.50)	26(31.00)	3.05 (1.24-7.49)	0.015	3.05 (1.24-7.49)	0.015
l/s	45 (51.10)	34(40.50)	3.18 (1.34-7.52)	0.009	3.18 (1.34-7.52)	0.009
s/s	10 (11.40)	24 (28.60)	referenca 1.0		referenca 1.0	
Dominantni model						
l/l	33 (37.50)	26(31.00)	referenca 1.0		referenca 1.0	
l/s-s/s	55 (62.50)	58 (69.00)	0.75 (0.40-1.41)	0.366	0.75 (0.40-1.41)	0.367
Recesivni model						
l/l-l/s	78 (88.60)	60 (71.40)	referenca 1.0		referenca 1.0	
s/s	10 (11.40)	24 (28.60)	0.32 (0.14-0.72)	<b>0.006**</b>	0.32 (0.14-0.72)	<b>0.006**</b>

CD – Crohnova bolest; *STin2* VNTR - engl. variable number of tandem repeats (VNTR) - u intron 2 *SLC6A4* gena;; OR – engl. odds ratio; CI – engl. confidence interval. l – Dugi (12) *STin2* aleli; s – kratki(10, 9) *STin2* aleli; 12, 10, 9: *STin2* VNTR aleli. †Bonferroni nekorogirane P vrijednosti. ‡Logistička regresijska analiza prilagođena s obzirom na dob i spol. § Sveukupna distribucija *STin2* VNTR genotipovi u CD i kontrolnoj skupini ispitanika:  $\chi^2 = 15.857$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.003$ .<sup>II</sup>Globalna P vrijednosti za logističku regresijsku analizu. ¶Rijetke genotipske varijante grupirane u jednu skupinu.\*\* Statistički značajne P vrijednosti (<Pc). Bonferroni korekcija za distribuciju genotipova Pc = 0.008 (0.05/6 – broj genotipova) i logističku regresijsku analizu Pc = 0.017 (0.05/3 – broj uspoređenih modela).

S obzirom na frekvenciju genotipova *5-HTTLPR* i *rs25531* SNP polimorfne regije *SLC6A4* gena nije uočena statistički značajna razlika ni prilikom usporedbe cjelokupne (muškarci + žene) CD skupine i kontrolnih ispitanika (tablica 5.6) kao ni prilikom usporedbe odgovarajućih podskupina pacijenata i kontrolnih ispitanika podijeljenih po spolu (Tablica 5.7 i 5.8). No unatoč tome vidljiva je veća, premda statistički nesignifikantna, učestalost heterozigotnih *LS*, *L<sub>AS</sub>* i *L'S'* te homozigotnih *SS* i *S'S'* (osim za bialelni *5-HTTLPR/rs25531* genetički model kod ženske podskupine bolesnika) genotipskih formi *5-HTTLPR* i *rs25531* polimorfne regije *SLC6A4* gena u skupini pacijenata sa Crohnovom bolesti (Tablica 5.6, 5.7 i 5.8).

Slični rezultata dobiveni su i prilikom logističke regresijske analize kodominantnog, dominantnog i recesivnog genotipskog modela 5-HTTLPR i rs25531 SNP polimorfne regije SLC6A4 gena koja je pokazala i pozitivnu, premda također statistički nesigificantnu, povezanost heterozigotnih LS, LAS i L'S' te homozigotnih SS i S'S' genotipskih formi sa pojavnošću bolesti (Tablica 5.11).

**Tablica 5.11 Logistička regresijska analiza 5-HTTLPR i rs25531 SNP polimorfno lokusa SLC6A4 gena**

Polimorfizam	n (%) ispitanika		Logistička regresija			
	CD	controls	neprilagođeni OR (95% CI)	P <sup>†</sup>	OR (95% CI) ‡	P <sup>†</sup>
<b>5-HTTLPR bialelni oblik<sup>§</sup></b>				0.180 <sup>¶</sup>		0.200 <sup>¶</sup>
Kodominantni model						
L/L	67 (34.9)	70 (44.6)	referenca 1.0		referenca 1.0	
L/S	97 (50.5)	68 (43.3)	1.50 (0.94-2.35)	0.090	1.48 (0.94-2.35)	0.090
S/S	28 (14.6)	19 (12.1)	1.54 (0.79-3.02)	0.210	1.52 (0.77-2.98)	0.230
Dominantni model						
L/L	67 (34.9)	70 (44.6)	referenca 1.0		referenca 1.0	
L/S-S/S	125 (65.1)	87 (55.4)	1.50 (0.97-2.31)	0.070	1.49 (0.97-2.30)	0.070
Recesivni model						
L/L-L/S	164 (85.4)	138 (87.9)	referenca 1.0		referenca 1.0	
S/S	28 (14.6)	19 (12.1)	1.24 (0.66-2.32)	0.500	1.22 (0.65-2.29)	0.530
<b>5-HTTLPR/rs25531 trialelni oblik<sup>§</sup></b>				0.670 <sup>¶</sup>		0.670 <sup>¶</sup>
Kodominantni model						
L <sub>A</sub> /L <sub>A</sub>	57 (29.7)	57 (36.3)	referenca 1.0		referenca 1.0	
L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub>	10 (5.2)	11 (7.0)	0.91 (0.36-2.31)	0.840	0.91 (0.36-2.31)	0.840
L <sub>A</sub> /S	88 (45.8)	60 (38.2)	1.47 (0.90-2.40)	0.130	1.47 (0.90-2.41)	0.130
L <sub>G</sub> /S	9 (4.7)	8 (5.1)	1.13 (0.41-3.12)	0.820	1.07 (0.38-2.98)	0.900
L <sub>G</sub> /L <sub>G</sub>	0 (0.0)	2 (1.3)	NA	0.990	NA	0.100
S/S	28 (14.6)	19 (12.1)	1.47 (0.74-2.93)	0.270	1.46 (0.73-2.90)	0.290
<b>5-HTTLPR/rs25531 bialelni oblik</b>				0.410 <sup>¶</sup>		0.410 <sup>¶</sup>
Kodominantni model						
L'/L'	57 (29.7)	57 (36.3)	referenca 1.0		referenca 1.0	
L'/S'	98 (51.0)	71 (45.2)	1.38 (0.86-2.23)	0.190	1.39 (0.86-2.24)	0.180
S'/S'	37 (19.3)	29 (18.5)	1.28 (0.69-2.35)	0.430	1.25 (0.68-2.31)	0.470
Dominantni model						
L'/L'	57 (29.7)	57 (36.3)	referenca 1.0		referenca 1.0	
L'/S'- S'/S'	135 (70.3)	100 (63.7)	1.35 (0.86-2.12)	0.190	1.346 (0.86-2.11)	0.200
Recesivni model						
L'/L'- L'/S'	155 (80.7)	128 (81.5)	referenca 1.0		referenca 1.0	
S'/S'	37 (19.3)	29 (18.5)	1.05 (0.61-1.81)	0.850	1.032 (0.60-1.77)	0.910

CD - Crohnova bolest; 5-HTTLPR – engl. serotonin reuptake transporter (SLC6A4) length polymorphic region; rs25531- engl. single nucleotide (SNP) polymorphism- nađen u dugom alelu 5-HTTLPR polimorfno lokusa; L': L<sub>A</sub>; S': L<sub>G</sub> ili S (klaster bialelni 5-HTTLPR/rs25531 model baziran na transkripcijskoj aktivnosti SLC6A4 gena: L'/L' > L'/S' > S'/S') OR- engl odds ratio; CI- engl. confidence interval. †Bonferroni nekorigirane P vrijednosti; Bonferroni korekcija za distribuciju genotipova Pc = 0.0083 (0.05/6 – broj genotipova) i za logističku regresijsku analizu Pc = 0.0166 (0.05/3 – broj uspoređenih genetičkih modela). ‡Logistička regresijska analiza prilagođena s obzirom na dob i spol. §Sveukupna distribucija 5-HTTLPR genotipova u CD i kontrolnoj skupini ispitanika:  $\chi^2 = 3.471$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.177$ ; ¶Globalna P vrijednost za logističku regresijsku analizu. ¶Sveukupna distribucija trialelnih 5-HTTLPR/rs25531 genotipova u CD i kontrolnoj skupini ispitanika:  $\chi^2 = 5.674$ ,  $df = 5$ ,  $P = 0.339$ .

### 5.3. Analiza povezanost 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena s fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti

Distribucije alela i genotipova 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena s obzirom na fenotipske podskupine pacijenata s Crohnovom bolešću (Bečka klasifikacija) prikazane su u tablici 5.12, 5.13, 5.14, 5.15 i 5.16.

**Tablica 5.12 Distribucija alela i genotipova STin2 VNTR polimorfnog lokusa - tralelni model – prema fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti**

STin2 VNTR tralelni model	Distribucija genotipova n (%)						Distribucija alela n (%)		
	10/9	12/9	10/10	12/10	12/12	9	10	12	10/9
<b>Dob pri dijagnozi</b>									
≤ 16 (n=21)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (9.5)	12 (57.1)	7 (33.3)	0 (0.0)	16 (38.1)	26 (61.9)	0 (0.0)
17-41 (n=153)	0 (0.0)	1 (0.7)	21 (13.7)	69 (45.1)	62 (40.5)	1 (0.3)	111 (36.3)	194 (63.4)	0 (0.0)
>41 (n=18)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (16.7)	8 (44.4)	7 (38.9)	0 (0.0)	14 (38.9)	22 (61.1)	0 (0.0)
<b>Lokalizacija bolesti</b>									
Ileum (L1) (n=60)	0 (0.0)	1 (1.7)	10 (16.7)	23 (38.3)	26 (43.3)	1 (1.0)	43 (36.0)	76 (63.0)	0 (0.0)
Kolon (L2) (n=34)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (17.6)	16 (47.1)	12 (35.3)	0 (0.0)	28 (41.18)	40 (58.82)	0 (0.0)
Ileokolon (L3) (n=91)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (11.0)	47 (51.6)	34 (37.4)	0 (0.0)	67 (36.8)	115 (63.2)	0 (0.0)
UGI (L4) (n=29)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (10.3)	11 (37.9)	15 (51.7)	0 (0.0)	17 (29.3)	41 (70.7)	0 (0.0)
bez UGI (n=157)	0 (0.0)	1 (0.6)	23 (14.6)	76 (48.4)	57 (36.3)	1 (0.3)	122 (38.85)	191 (60.82)	0 (0.0)
<b>Ponašanje bolesti</b>									
Inflamatorni (B1) (n=89)	0 (0.0)	1 (1.1)	13 (14.6)	42 (47.2)	33 (37.1)	1 (0.6)	68 (38.2)	109 (61.2)	0 (0.0)
Strukturirajući (B2) (n=64)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (14.1)	31 (48.4)	24 (37.5)	0 (0.0)	49 (38.3)	79 (61.7)	0 (0.0)
Penetrantni (B3) (n=39)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (10.3)	16 (41.0)	19 (48.7)	0 (0.0)	24 (30.8)	54 (69.2)	0 (0.0)
<b>Perianalna bolest</b>									
Da (n=63)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (15.9)	27 (42.9)	26 (41.3)	0 (0.0)	47 (37.3)	79 (62.7)	0 (0.0)
Ne (n=129)	0 (0.0)	1 (0.8)	16 (12.4)	62 (48.1)	50 (38.8)	1 (0.4)	94 (36.4)	163 (63.2)	0 (0.0)
<b>Ekstraintestinalne manifestacije</b>									
Da (n=43)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (16.3)	18 (41.9)	18 (41.9)	0 (0.0)	32 (37.2)	54 (62.8)	0 (0.0)
Ne (n=149)	0 (0.0)	1 (0.7)	19 (12.8)	71 (47.7)	58 (38.9)	1 (0.3)	109 (36.6)	188 (63.1)	0 (0.0)
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>									
Da (n=17)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)	7 (41.2)	9 (52.9)	0 (0.0)	9 (26.5)	25 (73.5)	0 (0.0)
Ne (n=175)	0 (0.0)	1 (0.6)	25 (14.3)	82 (46.9)	67 (38.3)	1 (0.3)	132 (37.7)	217 (62.0)	0 (0.0)
<b>Operativni zahvat</b>									
Da (n=105)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (11.4)	48 (45.7)	45 (42.9)	0 (0.0)	72 (34.3)	138 (65.7)	0 (0.0)
Ne (n=87)	0 (0.0)	1 (1.1)	14 (16.1)	41 (47.1)	31 (35.6)	1 (0.6)	69 (39.6)	104 (59.8)	0 (0.0)

**Tablica 5.13 Distribucija alela i genotipova STin2 VNTR polimorfnog lokusa - bijelelni model – prema fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti**

<i>STin2 VNTR bijelelni model</i>	<i>Distribucija genotipova n (%)</i>			<i>Distribucija alela n (%)</i>	
	<i>l/l</i>	<i>l/s</i>	<i>s/s</i>	<i>L</i>	<i>s</i>
<b><i>Dob pri dijagnozi</i></b>					
<i>≤ 16 (n=21)</i>	7 (33.3)	12 (57.1)	2 (9.5)	26 (61.9)	16 (38.1)
<i>17-41 (n=153)</i>	62 (40.5)	70 (45.8)	21 (13.7)	194 (63.4)	112 (36.6)
<i>&gt;41 (n=18)</i>	7 (38.9)	8 (44.4)	3 (16.7)	22 (61.11)	14 (38.89)
<b><i>Lokalizacija bolesti</i></b>					
<i>Ileum (L1) (n=60)</i>	26 (43.3)	24 (40.0)	10 (16.7)	76 (63.33)	44 (36.67)
<i>Kolon (L2) (n=34)</i>	12 (35.3)	16 (47.1)	6 (17.6)	40 (58.82)	28 (4.18)
<i>Ileokolon (L3) (n=91)</i>	34 (37.4)	47 (51.6)	10 (11.0)	115 (63.19)	67 (36.81)
<i>UGI (L4) (n=29)</i>	15 (51.7)	11 (37.9)	3 (10.3)	41 (70.69)	17 (29.31)
<i>bez UGI (n=157)</i>	57(36.31)	77(49.0)	23 (14.6)	191 (60.83)	123 (39.17)
<b><i>Ponašanje bolesti</i></b>					
<i>Inflamatorni (B1) (n=89)</i>	33 (37.1)	43 (48.3)	13 (14.6)	109 (61.24)	69 (38.76)
<i>Strukturirajući (B2) (n=64)</i>	24 (37.5)	31 (48.4)	9 (14.1)	79 (61.72)	49 (38.28)
<i>Penetrantni (B3) (n=39)</i>	19 (48.7)	16 (41.0)	4 (10.3)	54 (69.23)	24 (30.77)
<b><i>Perianalna bolest</i></b>					
<i>Da (n=63)</i>	26 (41.3)	27 (42.9)	10 (15.9)	79 (62.70)	47 (37.30)
<i>Ne (n=129)</i>	50 (38.8)	63 (48.8)	16 (12.4)	163 (63.18)	95 (36.82)
<b><i>Ekstraintestinalne manifestacije</i></b>					
<i>Da (n=43)</i>	18 (41.9)	18 (41.9)	7 (16.3)	54 (62.79)	32 (37.21)
<i>Ne (n=149)</i>	58 (38.9)	72 (48.3)	19 (12.8)	188 (63.09)	110 (36.91)
<b><i>Pozitivna obiteljska anamneza</i></b>					
<i>Da (n=17)</i>	9 (52.9)	7 (41.2)	1 (5.9)	25 (73.53)	9 (26.47)
<i>Ne (n=175)</i>	67 (38.3)	83 (47.4)	25 (14.3)	217 (62.0)	133 (38.8)
<b><i>Operativni zahvat</i></b>					
<i>Da (n=105)</i>	45 (42.9)	48 (45.7)	12 (11.4)	138 (65.71)	72 (34.29)
<i>Ne (n=87)</i>	31 (35.6)	42 (48.3)	14 (16.1)	104 (59.77)	70 (40.23)

**Tablica 5.14 Distribucija alela i genotipova HTTLRP polimorfnog lokusa - bialelni model – prema fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti**

<b>5-HTTLPR</b>	<b>Distribucija genotipova n (%)</b>			<b>Distribucija alela n (%)</b>	
	<b>L/L</b>	<b>L/S</b>	<b>S/S</b>	<b>L</b>	<b>S</b>
<b>Dob pri dijagnozi</b>					
≤ 16 (n=21)	8 (38.1)	8 (38.1)	5 (23.8)	24 (57.14)	18 (42.86)
17-41 (n=153)	51 (33.3)	83 (54.2)	19 (12.4)	185 (60.5)	121 (39.5)
>41 (n=18)	8 (44.4)	6 (33.3)	4 (22.2)	22 (61.1)	14 (38.9)
<b>Lokalizacija bolesti</b>					
Ileum (L1) (n=60)	23(38.3)	29 (48.3)	8 (13.3)	75 (62.5)	45 (37.5)
Kolon (L2) (n=34)	9 (26.5)	17 (50.0)	8 (23.5)	35 (51.47)	33 (48.53)
Ileokolon (L3) (n=91)	32 (35.2)	47 (51.6)	12 (13.2)	111 (61.0)	71 (39.0)
UGI (L4) (n=29)	9 (31.0)	14 (48.3)	6 (20.7)	32 (55.2)	26 (44.8)
bez UGI (n=157)	56 (35.7)	79 (50.3)	22 (14.0)	191 (60.8)	123 (39.2)
<b>Ponašanje bolesti</b>					
Inflamatorni (B1) (n=89)	31 (34.8)	41 (46.1)	17 (19.1)	103 (57.9)	75 (42.1)
Strukturirajući (B2) (n=64)	23 (35.9)	33 (51.6)	8 (12.5)	79 (61.7)	49 (38.3)
Penetrantni (B3) (n=39)	13 (33.3)	23 (59.0)	3 (7.7)	49 (62.8)	29 (37.2)
<b>Perianalna bolest</b>					
Da (n=63)	20 (31.7)	37 (58.7)	6 (9.5)	77 (61.1)	49 (38.9)
Ne (n=129)	47 (36.4)	60 (46.5)	22 (17.1)	154 (59.7)	104 (40.3)
<b>Ekstraintestinalne manifestacije</b>					
Da (n=43)	14 (32.6)	22 (51.2)	7 (16.3)	50 (58.1)	36 (41.9)
Ne (n=149)	53 (35.6)	75 (50.3)	21(14.1)	181 (60.7)	117 (39.3)
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>					
Da (n=17)	4 (23.5)	9 (52.9)	4 (23.5)	17 (50.0)	17 (50.0)
Ne (n=175)	63 (36.0)	88 (50.3)	24 (13.7)	214 (61.1)	136 (38.9)
<b>Operativni zahvat</b>					
Da (n=105)	38 (36.2)	53 (50.5)	14 (13.3)	129 (61.4)	81 (38.6)
Ne (n=87)	29 (33.3)	44 (50.6)	14 (16.1)	102 (58.6)	72 (41.4)

**Tablica 5.15 Distribucija alela i genotipova 5-HTTLPR/rs25531 polimorfnog lokusa - bialelni model – prema fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti**

<b>5-HTTLPR/rs25531 bialelni model</b>	<b>Distribucija genotipova n (%)</b>			<b>Distribucija alela n (%)</b>	
	<b>L'/L'</b>	<b>L'/S'</b>	<b>S'/S'</b>	<b>L'</b>	<b>S'</b>
<b>Dob pri dijagnozi</b>					
$\leq 16$ (n=21)	7 (33.3)	9 (42.9)	5 (23.8)	23 (54.76)	19 (45.24)
17-41 (n=153)	42 (27.5)	84 (54.9)	27 (17.6)	168 (54.9)	138 (45.1)
>41 (n=18)	8 (44.4)	5 (27.8)	5 (27.8)	21 (58.33)	15 (41.67)
<b>Lokalizacija bolesti</b>					
Ileum (L1) (n=60)	18 (30.0)	33 (55.0)	9 (15.0)	69 (57.5)	51 (42.5)
Kolon (L2) (n=34)	8 (23.5)	17 (50.0)	9 (26.5)	33 (48.53)	35 (51.47)
Ileokolon (L3) (n=91)	28 (30.8)	44 (48.4)	19 (20.9)	100 (54.95)	82 (45.05)
UGI (L4) (n=29)	8 (27.6)	15 (51.7)	6 (20.7)	31 (53.45)	27 (46.55)
bez UGI (n=157)	47 (29.9)	79 (50.3)	31 (19.7)	173 (55.1)	141 (44.9)
<b>Ponašanje bolesti</b>					
Inflamatorni (B1) (n=89)	28 (31.5)	39 (43.8)	22 (24.7)	95 (53.37)	83 (46.63)
Strukturirajući (B2) (n=64)	18 (28.1)	37 (57.8)	9 (14.1)	73 (57.0)	55 (43.0)
Penetrantni (B3) (n=39)	11 (28.2)	22 (56.4)	6 (15.4)	44 (56.41)	34 (43.59)
<b>Perianalna bolest</b>					
Da (n=63)	19 (30.2)	34 (54.0)	10 (15.9)	72 (57.14)	54 (42.86)
Ne (n=129)	38 (29.5)	64 (49.6)	27 (20.9)	140 (54.26)	118 (45.74)
<b>Ekstraintestinalne manifestacije</b>					
Da (n=43)	14 (32.6)	20 (46.5)	9 (20.9)	48 (55.81)	38 (44.19)
Ne (n=149)	43 (28.9)	78 (52.3)	28 (18.8)	164 (55.03)	134 (44.97)
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>					
Da (n=17)	4 (23.5)	9 (52.9)	4 (23.5)	17 (50.0)	17 (50.0)
Ne (n=175)	53 (30.3)	89 (50.9)	33 (18.9)	195 (55.71)	155 (44.29)
<b>Operativni zahvat</b>					
Da (n=105)	31 (29.5)	55 (52.4)	19 (18.1)	117 (55.71)	93 (44.29)
Ne (n=87)	26 (29.9)	43 (49.4)	18 (20.7)	95 (54.6)	79 (45.4)



**Tablica 5.16 Distribucija alela i genotipova 5-HTTLPR/rs25531 polimorfnog lokusa - trialelni model – prema fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti**

5-HTTLPR/ rs25531 trialelni model	Genotype distribution n (%)						Allele frequencies n (%)		
	LA/LA	LA/LG	LA/S	LG/S	LG/LG	S/S	LA	LG	S
<b>Dob pri dijagnozi</b>									
≤ 16 (n=21)	7 (33.3)	1 (4.8)	8 (38.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (23.8)	23 (54.76)	1 (2.38)	18 (42.86)
17-41 (n=153)	42 (27.5)	9 (5.9)	75 (49.0)	8 (5.2)	0 (0.0)	19 (12.4)	168 (54.9)	17 (5.56)	121 (39.54)
>41 (n=18)	8 (44.4)	0 (0.0)	5 (27.8)	1 (5.6)	0 (0.0)	4 (22.2)	21 (58.33)	1 (2.77)	14 (38.9)
<b>Lokalizacija bolesti</b>									
Ileum (L1) (n=60)	18 (30.0)	5 (8.3)	28 (46.7)	1 (1.7)	0 (0.0)	8 (13.3)	69 (57.5)	6 (5.0)	45 (37.5)
Kolon (L2) (n=34)	8 (23.5)	1 (2.9)	16 (47.1)	1 (2.9)	0 (0.0)	8 (23.5)	33 (48.53)	2 (2.94)	33 (48.53)
Ileokolon (L3) (n=91)	28 (30.8)	4 (4.4)	40 (44.0)	7 (7.7)	0 (0.0)	12 (13.2)	100 (54.95)	11 (6.04)	71 (39.01)
UGI (L4) (n=29)	8 (27.6)	1 (3.4)	14 (48.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (20.7)	31 (53.45)	1 (1.72)	26 (44.83)
bez UGI (n=157)	47 (29.9)	9 (5.7)	70 (44.6)	9 (5.7)	0 (0.0)	22 (14.0)	173 (55.1)	18 (5.73)	123 (39.17)
<b>Ponašanje bolesti</b>									
Inflamatorni (B1) (n=89)	28 (31.5)	3 (3.4)	36 (40.4)	5 (5.6)	0 (0.0)	17 (19.1)	95 (53.37)	8 (4.5)	75 (42.13)
Strukturirajući (B2) (n=64)	18 (28.1)	5 (7.8)	32 (50.0)	1 (1.6)	0 (0.0)	8 (12.5)	73 (57.03)	6 (4.69)	49 (38.28)
Penetrantni (B3) (n=39)	11 (28.2)	2 (5.1)	20 (51.3)	3 (7.7)	0 (0.0)	3 (7.7)	44 (56.41)	5 (6.41)	29 (37.18)
<b>Perianalna bolest</b>									
Da (n=63)	19 (30.2)	1 (1.6)	33 (52.4)	4 (6.3)	0 (0.0)	6 (9.5)	72 (57.14)	5 (3.97)	49 (38.89)
Ne (n=129)	38 (29.5)	9 (7.0)	55 (42.6)	5 (3.9)	0 (0.0)	22 (17.1)	140 (54.26)	14 (5.43)	104 (40.31)
<b>Ekstraintestinalne manifestacije</b>									
Da (n=43)	14 (32.6)	0 (0.0)	20 (46.5)	2 (4.7)	0 (0.0)	7 (16.3)	48 (55.81)	2 (2.33)	36 (41.86)
Ne (n=149)	43 (28.9)	10 (6.7)	68 (45.6)	7 (4.7)	0 (0.0)	21 (14.1)	164 (55.03)	17 (5.71)	117 (39.26)
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>									
Da (n=17)	4 (23.5)	0 (0.0)	9 (52.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (23.5)	17 (50.0)	0 (0.0)	17 (50.0)
Ne (n=175)	53 (30.3)	10 (5.7)	79 (45.1)	9 (5.1)	0 (0.0)	24 (13.7)	195 (55.71)	19 (5.43)	136 (38.86)
<b>Operativni zahvat</b>									
Da (n=105)	31 (29.5)	7 (6.7)	48 (45.7)	5 (4.8)	0 (0.0)	14 (13.3)	117 (55.72)	12 (5.71)	81 (38.57)
Ne (n=87)	26 (29.9)	3 (3.4)	40 (46.0)	4 (4.6)	0 (0.0)	14 (16.1)	95 (54.6)	7 (4.02)	72 (41.38)

Upotrebom Pearsonovog  $\chi^2$  test statistički značajna razlika između subfenotipa CD-a klasificiranih prema Montrealskoj klasifikaciji (dob u početku bolesti, lokalizacija bolesti, ponašanje bolesti itd.) utvrđena je samo za 5-HTTLPR polimorfizam i klasterni bialelni model *HTTLPR/rs25531* genotipa s obzirom na dob pri dijagnozi bolesti.

Pri tome su sve varijante 5-HTTLPR genotipa (*LL*, *LS* i *LL*) pokazale slične učestalosti kod mlađih (A1) i starijih (A3) CD bolesnika dok su nositelji heterozigotnog (*LS*) genotipa bili pozitivno povezani sa A2 dobnom skupinom (Pearsonov P = 0,040663, Fisher-ov P = 0,0488, Phi = +0,015, OR 2.1173, 95% CI: 1,0229-4,3826).

Nasuprot tome klasterni bialelni genotip *L'S'* (intermedijarna ekspresijska aktivnost) aktivnost pokazao je statistički značajnu povezanost sa A2 i A3 dobnom skupinom, pri čemu je u A2 skupini uočena njegova pozitivna (Pearsonov P = 0,034, Fisherov P = 0,049, OR 2,1739, 95% CI 1,0501 - 4,5005), a u A3 skupini (Pearsonov P = 0,038, Fisherov P = 0,049, OR 0,335, 95% CI 0,1145 - 0,9801) negativna povezanost sa pojavnošću Crohnove bolesti.

No, niti jedna od genotipskih formi 5-HTTLPR polimorfnog lokusa nije se pokazala statistički signifikantnom nakon primjene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c = 0.05/N$ ; N– broj analiziranih genotipova).

Prevalencija *STin2 ss* genotipa bila je statistički značajno niža u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti na ileokolonu u odnosu na kontrole ( $\chi^2=6,45$ ;  $df=1$ ;  $p=0,011$   $\phi=-0,16$ ; OR = 0,32; 95% CI= 0.18-0.82). Pri tome je univarijantna logistička regresija pokazala da nosioci *ll* i *ls* genotipa imaju dva puta veće izgleda za Crohnovu bolest na ileokolonu u odnosu na one sa *ss* genotipom [*ll*: OR=2,35; 95% CI=1,04-5.32,  $p= 0.041$ ; *ls*: OR=2,79; 95% CI=1,26-6.16,  $p= 0.011$ ] pri čemu je samo *ls* genotip pokazao statistički značajnu razliku ( $p=0.011$ ) nakon primijene znatno liberalne Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c = 0.05/N$ ; N– broj analiziranih genotipova; N=3). To je potvrđeno i multivarijantnom logističkom regresijom prilagođenom za dob i spol [*ll*: OR=2,29; 95% CI=1,01-5.20,  $p= 0.048$ ; *ls*: OR=2,75; 95% CI=1,24-6.09,  $p= 0.013$ ] + druga dva (5-HTTLPR/rs25531) polimorfna lokusa [*ll*: OR=2,22; 95% CI=0.97-5.07,  $p= 0.059$ ; *ls*: OR=2,76; 95% CI=1,24-6.12,  $p= 0.013$ ].

Prevalencija *STin2 ss* genotipa bila je statistički značajno niža i u skupini CD bolesnika bez perianalne bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu ( $\chi^2= 6.44$ ;  $df=1$ ;  $p=0,011$ ;  $\phi=-0,15$ ;  $OR = 0.44$ ;  $95\% CI= 0.23-0.84$ ). I ovdje je univarijantna logistička regresija pokazala da nosioci *ll* i *ls* genotipa imaju dva puta veće izgleda za Crohnovu bolest na ileokolonu u odnosu na one sa *ss* genotipom [*ll*:  $OR=2,16$ ;  $95\% CI=1,07-4.34$ ,  $p= 0.031$ ; *ls*:  $OR=2,34$ ;  $95\% CI=1,19-4.61$ ,  $p= 0.014$ ] pri čemu je i u ovom slučaju samo *ls* genotip pokazao statistički značajnu razliku ( $p=0.014$ ) nakon primijene znatno liberalne Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c= 0.05/N$ ;  $N$ – broj analiziranih genotipova;  $N=3$ ). To je potvrđeno i multivarijantnom logističkom regresijom prilagođenom za dob i spol [*ll*:  $OR=2,11$ ;  $95\% CI=1,05-4.26$ ,  $p= 0.037$ ; *ls*:  $OR=2,32$ ;  $95\% CI=1,17-4.57$ ,  $p= 0.0157$ ] + druga dva ( *5-HTTLPR/rs25531*) polimorfna lokusa [*ll*:  $OR=2,03$ ;  $95\% CI=0.99-4.17$ ,  $p= 0.059$ ; *ls*:  $OR=2,31$ ;  $95\% CI=1,17-4.58$ ,  $p= 0.0159$ ].

Osim u ta dva slučaja prevalencija *STin2 ss* genotipa bila je statistički značajno niža i u skupini CD bolesnika bez ekstraintestinalnih manifestacija bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu ( $\chi^2= 6.61$ ;  $df=1$ ;  $p=0,010$ ;  $\phi=-0,15$ ;  $OR = 0.46$ ;  $95\% CI= 0.25-0.84$ ). I u ovdje je univarijantna logistička regresija pokazala da nosioci *ll* i *ls* genotipa imaju dva puta veće izgleda za Crohnovu bolest na ileokolonu u odnosu na one sa *ss* genotipom [*ll*:  $OR=2,11$ ;  $95\% CI=1,09-4.09$ ,  $p= 0.027$ ; *ls*:  $OR=2,25$ ;  $95\% CI=1,18-4.29$ ,  $p= 0.014$ ] pri čemu je i u ovom slučaju samo *ls* genotip pokazao statistički značajnu razliku ( $p=0.014$ ) nakon znatno liberalne primijene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c= 0.05/N$ ;  $N$ – broj analiziranih genotipova;  $N=3$ ). To je potvrđeno i multivarijantnom logističkom regresijom prilagođenom za dob i spol [*ll*:  $OR=2,03$ ;  $95\% CI=1,04-3.96$ ,  $p= 0.037$ ; *ls*:  $OR=2,22$ ;  $95\% CI=1,16-4.25$ ,  $p= 0.0157$ ] + druga dva ( *5-HTTLPR/rs25531*) polimorfna lokusa [*ll*:  $OR=1.97$ ;  $95\% CI=1.00-3.85$ ,  $p= 0.049$ ; *ls*:  $OR=2,21$ ;  $95\% CI=1,15-4.23$ ,  $p= 0.017$ ]. No u zadnjem slučaju je statistička vrijednost bialelne *ss* genotipske forme *Stin2 VNTR* lokusa nije bila manja od  $P_c$  ( $P_c=0.05/N$ - broj analiziranih genotipova=  $0.0166$ ;  $N=3$ ).

Ovdje treba napomenuti da u slučaju znatno striktnije primjene Bonferroni korekcije ( $P_c=0.05/N$ - broj analiziranih genotipova=  $0.008$ ;  $N=6$ ) niti jedna od gore navedenih  $P$  vrijednosti ne bi bila statistički signifikantna.

U slučaju međusobne usporedbe različitih podskupina Crohnove bolesti (primjerice ileokolon vs. ileum, luminalni vs. strikturirajući, perianalni vs. bez perianalne bolesti itd) upotreba Pearsonovog  $\chi^2$  test kao ni univarijantna i multivarijantna logistička regresija nisu pokazale statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela promatranih polimorfnih lokusa ( *5-HTTLPR*, *rs25531 SNP* i *Stin2 VNTR*) *SLC6A4* gena.

#### **5.4. Analiza haplotipova 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 VNTR polimorfnih regija SERT/SLC6A4 gena**

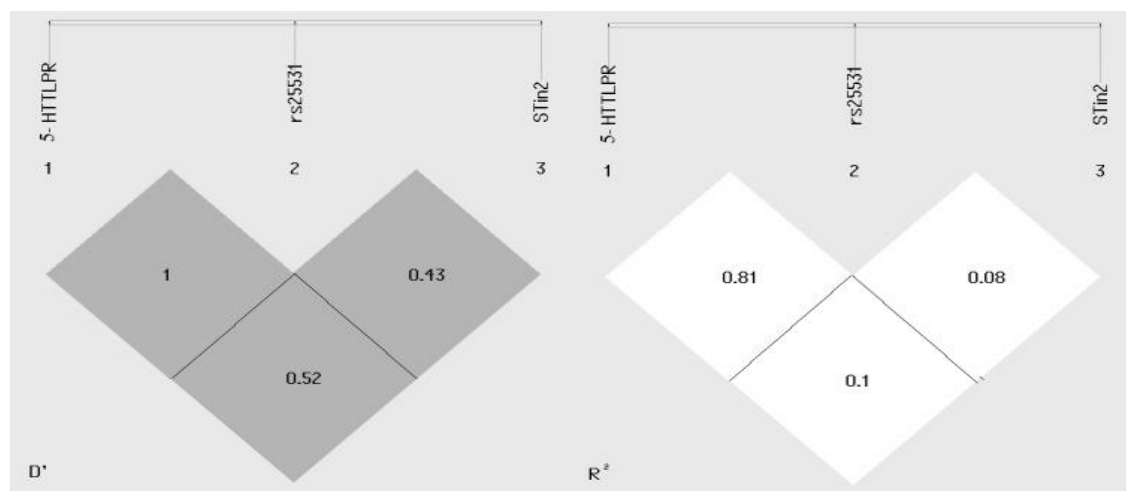
Konstrukcija haplotipova, analiza neravnoteže vezanja (LD-a engl. *linkage disequilibrium*) i asocijacijska analiza haplotipova provedeni su uporabom SHEsisPlus programa (<http://shesisplus.bio-x.cn/SHEsis.html>) (353).

Kao što se moglo i očekivati 5-HTTLPR i rs25531 polimorfna regija pokazale su jaku neravnotežu vezanja (LD) dok su vrijednosti LD-a između ta dva lokusa i STin2 VNTR-a relativno slabije (Slika 5.1).

Nakon Bonferroni korekcije statistički značajna razlika ( $P = 0,004$ ; OR = 1.62, 95% CI = 1.16 - 2.26) u distribuciji haplotipova unutar skupine CD pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika zabilježena je samo u slučaju S-S-STin2.12 haplotipa (Tablica 5.1).

Veća, premda statistički nesignifikantna ( $P = 0.694$ ; OR = 1.23, 95% CI = 0.43 - 3.50), učestalost unutar skupine CD pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike zabilježena je i u slučaju L-LG-STin2.10 haplotipa (Tablica 5.1).

**Slika 5.1 LD, D' i R<sup>2</sup> vrijednosti 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 polimorfnih regija SLC6A4 gena**



R<sup>2</sup>- kvadrat korelacijske vrijednosti između dvije indikatorske varijable – jedne koja predstavlja prisutnost ili odsutnost određenog alela u prvom lokusu i druge koja predstavlja prisutnost ili odsutnost određenog alela u drugom lokusu. Vrijednosti r<sup>2</sup> variraju od r<sup>2</sup>= 0- dva lokusa su u potpunoj ravnoteži do r<sup>2</sup> = 1 - dva lokusa su u neravnoteži; D' –vrijednost varira od -1 do 1 za bilo koji skup frekvencija alela za par polimorfnih bialelnih markera

**Tablica 5.17. Učestalost SLC6A4 haplotipova u CD i kontrolnoj skupini ispitanika**

SLC6A4 haplotipovi			n. (%) ispitanika		χ <sup>2</sup>	P <sup>†</sup>	OR (95% CI) <sup>†</sup>
5-HTTLPR	rs25531	STin2 VNTR	CD	kontrola			
L	L <sub>A</sub>	STin2 10	110 (28.6)	97 (30.8)	0.417	0.518	0.89 (0.65-1.24)
S	-	STin2 12	131 (34.1)	76 (24.2)	8.133	<b>0.004</b> <sup>‡</sup>	1.62 (1.16-2.26)
L	L <sub>A</sub>	STin2 12	102 (26.5)	88 (28.0)	0.186	0.665	0.93(0.66-1.30)
L	L <sub>G</sub>	STin2 10	9 (2.3)	6 (1.9)	0.153	0.694	1.23 (0.43-3.50)
S	-	STin2 10	22 (5.7)	27 (8.5)	2.179	0.139	0.65 (0.36-1.16)
L	L <sub>G</sub>	STin2 12	9 (2.3)	10 (3.1)	0.461	0.496	0.73 (0.29-1.82)
L	L <sub>G</sub>	STin2 9	1 (0.2)	7 (2.2)	5.910	0.015	0.11 (0.01-0.94)
S	-	STin2 9	0 (0.0)	3 (0.9)	3.684	0.054	NP

CD – Crohnova bolest; 5-HTTLPR – engl. serotonin reuptake transporter (SERT/SLC6A4) length polymorphic region; STin2 VNTR – engl. variable number of tandem repeats (VNTR) – u intronu 2 SLC6A4 gena; rs25531 – SNP polimorfizam – unutar dugog (L) alela 5-HTTLPR polimorfnog lokusa; L<sub>G</sub> – dugi 5-HTTLPR alel sa slabijim ponovnim unosom serotonina i smanjenom transkripcijskom aktivnošću u odnosu na kratki (S) alel; Sveukupni rezultat– Pearsonov χ<sup>2</sup> = 18.29, P = 0.011; OR – engl. odds ratio; CI – engl. confidence interval. <sup>†</sup> Bonferroni neprilagođene P vrijednosti i intervali pouzdanosti; Bonferroni korekcija za analizu haplotipova: P<sub>c</sub> = 0.006 (0.05/8 – broj usporedbi haplotipova).<sup>‡</sup> Statistički značajne P vrijednosti (<P<sub>c</sub>).

## **6. RASPRAVA**



Upalna bolest crijeva kao što su Crohnova bolest i ulcerozni kolitis predstavljaju glavni, relapsirajući gastrointestinalni poremećaj, s kombiniranom incidencijom od 2-20 na 100.000 pojedinaca u razvijenim zemljama svijeta (358-361).

Na sklonost ka razvoju upalnih bolesti crijeva mogu utjecati razni čimbenici, uključujući nasljednu predispoziciju, promjene u mobilnosti/peristaltici gastrointestinalnog sustava, odgovor na stresni podražaj, visceralnu preosjetljivost te nenormalan imunološki odgovor i njegovu reakcija na disbiozu crijevnog mikrobioma (358-361).

Neuroimunološke interakcije također su značajne jer različiti pro- i protuupalni citokini koji pri tome nastaju mogu utjecati na aktivnost neurona i oslobađanje neurotransmitera koji potom na različite načine djeluju na aktivnost imunoefektorskih stanica prisutnih uzduž stijenke gastrointestinalnog sustava.

Među njima je najdetaljnije istražena uloga 5-hidroksitriptamina (5-HT) odnosno serotonina, 95% kojeg proizvode i izlučuju enterokromafine stanice sluznice crijeva (195-218).

Promjene u biosintezi, količini, oslobađanju ili klirensu serotonina važne su za transdukciju senzornog signala u pokretljivosti stijenke gastrointestinalnog sustava i za razvoj visceralne preosjetljivosti (179, 184, 193, 211).

Serotonin je također kemotaktička molekula i može pospješiti aktivaciju limfocita i izlučivanje protuupalnih citokina (179, 184, 193, 211).

Stoga se, nakon oslobađanja i vezanja na ciljane receptore, magnitude, trajanja i prostorna raspodjela signala koji dosežu serotoninske homo- i hetero receptorske komplekse smještene na plazma membrani ciljanih stanica [primjerice intrinzični i ekstrinzični neuroni crijevne stijenke, enterociti i vrčaste (engl. *Goblet cells*) stanice u sluznici crijeva

te dendritične stanice u lamini proprijij] mora brzo prekinuti. To se odvija djelovanjem SERT transportera (212, 217, 225, 296).

Zbog toga promjene u ekspresiji i/ili aktivnosti SERT proteina mijenjaju ekspresiju i/ili funkciju većine, ako ne i svih, serotoninskih receptora, kao i sintezu, dostupnost, klirens i metabolizam serotonina (212, 217, 225, 296).

Izmijenjena funkcija i redukcija ekspresije SERT proteina kao i nenormalna koncentracija serotonina (lokalno u epitelnom sloju crijeva te u cirkulaciji) dokumentirana je u različitim kliničkim entitetima upalnih bolesti crijeva čovjeka, uključujući tu Crohnovu bolest, ulcerozni kolitis i mikroskopski kolitis te divertikulitis i celijakiju (202, 226, 241, 273, 282-296, 362).

Izmijenjena serotoninska signalizacija i ekspresija *SLC6A4* gena također je dokumentirana i u velikom broju animalnih modela upalnih bolesti crijeva (227, 228, 236, 237, 247).

Čini se da različiti proupalni medijatori i čimbenici rasta koji se oslobađaju tijekom upalne bolesti crijeva mogu inhibirati transkripciju *SLC6A4* gena te samim time dovesti do smanjene ekspresije i poremećaja u funkciji SERT proteina (274, 331- 333).

Druga mogućnost je da pojedinci s upalnim bolestima crijeva imaju genetsku predispoziciju koja je sama po sebi odgovorna za promijenjenu ekspresiju *SLC6A4* gena, čime se modulira 5-HT signalizacija te na taj način doprinosi proupalnom stanju u zahvaćenoj crijevnoj sluznici.

Do sada je unutar *SLC6A4* gena opisan veliki broj genetskih varijacija uključujući tu brojne rijetke te znatno češće *SNP* varijacije (npr. Rs25531, rs25532 i P339L), VNTR polimorfizme u 2 i 7 intronu gena te indel mutacije/varijacije prisutne u promotorskoj 5 – HTTLPR regiji gena kao i manje uobičajene polimorfne varijante (*I425V*, *I425L* i *G56A*) u kodirajućim područjima gena (296).

Kratki S alel polimorfne 5-HTTLPR promotorske regije SLC6A4 gena kao i L<sub>G</sub> varijanta 5-HTTLPR/rs25531 SNP polimorfizma te STin2.9 ili STin2.10 aleli polimorfne VNTR regije u drugom intronu SLC6A4 gena mogu dovesti do 50-80 % smanjene ekspresije SERT proteina. Nasuprot tome aleli sa većom ekspresijskom aktivnošću mogu dovesti i do 5 puta veće ekspresije SLC6A4 gena (296, 309, 319, 363-368).

Nadalje, kombinacija tih učestalih polimorfizma i manje zastupljenih varijanti SLC6A4 gena, poput primjerice P339L, mogu rezultirati peterostrukom do dvadeseterostrukom razlikom u ekspresijskoj i funkcionalnoj aktivnosti SERT proteina (296).

No unatoč spoznaji da upalne bolesti crijeva imaju snažnu genetsku komponentu, polimorfne varijante SERT gena do sada nisu povezane sa patogeneom CD-a.

Zbog toga je u ovoj studiji istražena povezanost 5-HTTLPR, rs25531 SNP i STin2 VNTR polimorfnih regija SLC6A4 gena s pojavnošću Crohnove bolesti unutar tzv. Case-control studije hrvatske populacije CD pacijenata.

Frekvencija genotipova i alelnih formi promotorske (5-HTTLPR i rs25531) i intronske STin2 VNTR polimorfne regije SLC6A4 gena u zdravoj kontrolnoj skupini obuhvaćenoj ovom studijom u potpunom je skladu sa do sada objavljenim podacima za hrvatsku i druge Europske populacije (304-307, 348, 355-357, 369-370).

Rezultati ove studije pokazali su značajnu razliku u distribuciji genotipova i alela STin2 VNTR polimorfnog lokusa SLC6A4 gena te statistički značajnu negativnu povezanost bialelne ss (STin2. 10/10 i STin2. 10/9 nasuprot STin2. 12/12 + STin2. 12/10 + STin2. 12/9) genotipske forme polimorfne STin2 VNTR regije unutar cjelokupne (muškarci + žene) CD grupe kao i unutar ženske podskupine CD pacijenata u odnosu na odgovarajuće skupine zdravih, kontrolnih ispitanika.

Učestalost 9, 10, i 12 STIN2 VNTR alela u kontrolnoj skupini ispitanika obuhvaćenih ovom studijom (3.19%, 41.40%, i 55.41%.) poklapala se sa rasponom tih alela u

kontrolnim skupinama iz drugih Europskih populacija (1%–3%, 32%–42%, 56%–66%) (307).

Interesantno je da smo u ovoj studiji detektirali samo jedan alel (0.3%) sa 9 VNTR ponavljanja unutar skupine CD pacijenata dok su frekvencije *STn2* alela sa 12 i 10 VNTR ponavljanja u rasponu onih za zdrave kontrolne ispitanike unutar Europske populacije stanovništva.

Postoje indicije da *STin2 VNTR* polimorfna regija može djelovati kao transkripcijski regulator *SLC6A4* gena na alelu ovisan način tako da dugi *STin2.12* alel koji ima jača tzv. „*enhancer-like*“ svojstva u odnosu na kraći *STin2.10* alel sa manjim brojem ponavljanja (307, 367, 371, 372).

Sasvim iznenađujuće, u našoj je studiji *STin2.12* alel pokazao tendenciju prema većoj učestalosti u sveukupnoj skupini CD bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika kao i u odgovarajućim podskupinama pacijenata podijeljenim po spolu.

Iako se veća učestalost transkripcijski učinkovitijeg *STin2.12* alela uočena među pacijentima obuhvaćenima ovom studijom ne slaže sa smanjenom ekspresijom i nižom imunoreaktivnošću SERT proteina dokumentiranom u velikom broju studija o upalnim bolestima crijeva kod ljudi, uključujući tu i Crohnovu bolest, negativna povezanost kratke (*ss*; *s* = *STin2.10* ili *STin2.9*) bialelne genotipske forme *STin2 VNTR* polimorfne regije sa pojavnošću CD-a u ovoj studiji potvrđen je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijskom analizom recesivnog bialelnog modela nasljeđivanja (*ll* + *ls* vs *ss*).

Pretpostavlja se da pojedinačni polimorfizmi imaju slab utjecaj u usporedbi s kombiniranim učinkom *5-HTTLPR* i *STin2 VNTR* polimorfnih regija na ekspresiju *SLC6A4* gena (307, 371).

Shodno tome, prije donošenja zaključka o njihovoj funkcionalnoj i fenotipskoj asocijaciji sa pojedinim kliničkim stanjima potrebno je identificirati kombinaciju njihovih alela formi odnosno učestalost odgovarajućih haplotipova.

Pri tome je LD između ova dva polimorfna lokusa *SLC6A4* gena u rasponu od umjerenog (Europa) do vrlo jakog (nativni Amerikanci) detektiran u većini do sada analiziranih populacija (372).

Neke studije ukazuju na djelomičnu povezanost *STin 2.12* alela sa kratkim (*S*) alelom *5-HTTLPR* polimorfne regije pri čemu haplotipovi s tom kombinacijom alela imaju jača „enhancer-like“ svojstva u odnosu na haplotip sa *L+STin2.10* i *S+STin2.10* haplotipom (373-375).

U ovoj studiji je također potvrđena veća učestalost *S-STin2.12* (*5-HTTLPR / rs25531: S-STin2: STin2.12*) haplotipa koji je pozitivno i statistički signifikantno povezan sa CD skupinom bolesnika dok je *L-STin2.9* (*5-HTTLPR / rs25531: LG - STin2: STin2.12*) haplotip (nakon Bonferroni korekcije), premda statistički nesignifikantno, negativno povezan sa pojavnošću CD-a.

S obzirom na povezanost *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena s fenotipskim karakteristikama Crohnove bolesti, prevalencija *STin2 ss* genotipa u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika bila je statistički značajno niža i u skupini CD bolesnika bez perianalne bolesti kao i u skupini CD bolesnika bez ekstraintestinalnih manifestacija što je potvrđeno i multivarijantnom logističkom regresijom prilagođenom za dob i spol + druga dva polimorfna lokusa (*HTTLPR/rs25531*). No u zadnjem slučaju je statistička vrijednost bialelne *ss* genotipske forme *Stin2 VNTR* lokusa nije bila manja od  $P_c$  ( $P_c=0.05/N$ - broj analiziranih genotipova= 0.0166;  $N=3$ ).

No, ovdje treba napomenuti da u slučaju znatno striktnije primjene Bonferroni korekcije ( $P_c=0.05/N$ - broj analiziranih genotipova= 0.008;  $N=6$ ) niti jedna od gore navedenih  $P$  vrijednosti ne bi bila statistički signifikantna.

Osim toga u niti jednom slučaju međusobne usporedbe različitih podskupina Crohnove bolesti (primjerice ileokolon vs. ileum, luminalni vs. strikturirajući, perianalni vs. bez perianalne bolesti itd.) upotreba Pearsonovog  $\chi^2$  test kao ni univarijantna i multivarijantna logistička regresija nisu pokazale statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela *Stin2 VNTR* polimorfnog lokusa *SLC6A4* gena.

Koliko nam je poznato, ovo je prva studija koja analizira potencijalnu povezanost *STin2 VNTR* polimorfizma i upalnih bolesti crijeva.

Nasuprot tome, do sada je objavljeno desetak studija u kojima je analizirana povezanost *STN2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena i sindroma iritabilnog crijeva (IBS; engl. *Irritable bowel syndrome*) (376-385).

Iako se IBD i IBS klasično gledaju kao dihotomna stanja, ova dva klinička entiteta dijele slične promjene u serotonergičkim-signalnim mehanizmima (273, 335, 386-393).

Nadalje, budući da IBS u nekim skupinama bolesnika može predstavljati upalno stanje niskog stupnja te zbog razvoja simptoma IBS-a kod bolesnika s IBD-om u remisiji kao i zbog opaženog kliničkog preklapanja između IBD-a i IBS-a, neki autori tvrde da oni u stvari mogu predstavljati kliničku manifestacije patofiziološkog spektra jedne te iste bolesti (394).

Osim toga, IBD pacijenti često pokazuju crijevne simptome koji nalikuju IBS-u, poput trbušne nelagode / boli, proljeva i obilježja poremećene defekacije (395-397).

Tako na primjer, zabilježena prevalencija simptoma nalik IBS-u kod CD pacijenata u varira od 42% do 57% ( 396, 397).

Nekoliko populacijskih studija pokazalo je i da pacijenti inicijalno s IBS imaju povećani rizik (5–10 puta) ka promjeni dijagnoze i naknadnom svrstavanju u skupinu IBD bolesnika u usporedbi s onima bez povijesti IBS-a. Prema nekim pokazateljima taj učinak može biti veći za Crohnovu bolest (398-400).

No unatoč svemu tome, do danas je u samo dvije studije istaknuta povezanost između *STin2 VNTR* polimorfizma i pojavnosti IBS-a.

Tako su Wang i suradnici objavili veću učestalost *STin2.12/10* genotipa u skupini IBS bolesnika u odnosu na kontrolne ispitanike, dok su bolesnici s prevladavajućom konstipacijskom formom IBS-a (IBS-C) pokazali povećanu učestalost *STin2 VNTR 12/12* i *5-HTTLPR LL* genotipa (*1212-LL*) u odnosu na kontrolne ispitanike i bolesnike s kojih prevladava IBS sa dijarejom (IBS-D) te kombinirani oblik IBS-a s proljevom i opstipacijom (IBS-M) (381). Slične rezultate Chen i suradnici objavili su kod pacijenata sa postinfekcijskim IBS-om (382).

No za razliku od njih, ostale studije nisu pokazale postojanje statistički značajne povezanosti između polimorfni varijanti *STin2 VNTR* regije *SLC6A4* gena i pojavnosti IBS-a (338, 376- 380, 383-385).

S obzirom na povezanost promotorskih polimorfni regija i CD-a, do sada je objavljen samo jedan rad u kom je izvršena analiza povezanost *5-HTTLPR* polimorfne regije s pojavnošću Crohnove bolesti (282).

Pored toga do sada su objavljena samo dva rada u kojima su analizirana oba polimorfna područja promotorske regije *SLC6A4* gena (*5-HTTLPR* i *rs25531*) u skupini pacijenata sa ulceroznim kolitisom i/ili mikroskopskim kolitisom te, osim rezultata ove studije, niti jedan rad u kom se je izvršila analiza povezanosti *rs25531 SNP-a* i pojavnosti Crohnove bolesti (279, 280, 362).

Kao što je već spomenuto, promotorska *5-HTTLPR* polimorfna regija *SLC6A4* gena manifestira se u bialelnom obliku, ali zbog otkrivene funkcionalne povezanosti s *rs25531 (A / G) SNP* polimorfizmom koji se nalazi u pozadini njegovog dugog (L) alela često se analizira u trialelnom obliku (312, 313).

Zbog njihove blizine u promotorskoj regiji *SLC6A4* gena, *5-HTTLPR* i *rs25531* polimorfne regije su funkcionalno izrazito povezane, ali imaju suprotstavljene učinke na ekspresiju SERT proteina.

Pri tome je *S* alel 5-HTTLPR-a polimorfne regije povezan je s nižom transkripcijskom aktivnošću od *L* alela što dovodi do smanjene ekspresije SERT proteina na staničnoj membrani te posljedično povećane razine serotonina (309-311).

Nasuprot tome, manje učestali rs25531  $L_G$  alel u kombinaciji sa *L* alelom 5-HTTLPR polimorfne regije *SLC6A4* gena, dovodi do smanjene transkripcije u usporedbi sa  $L_A$  5-HTTLPR/rs25531 alelnom formom (311, 314- 316).

Budući da HTTLPR/rs25531  $L_G$  alel pokreće ekspresiju *SLC6A4* gena gotovo ekvivalentno kratkom *S* alelu promotorske 5-HTTLPR polimorfne regije, takve alelne razlike mogu biti klinički važne. Stoga smo u ovoj studiji izvršili analizu u odnosu na pojedinačni bialelni 5-HTTLPR i trialelni HTTLPR/rs25531 model genotipa te s obzirom na visoku ( $L'L' = L_A / L_A$ ), intermedijarnu ( $L'S' = L_A/S + L_A/L_G$ ) odnosno nisku ( $S'S' = LG/LG + SS + L_G/S$ ) transkripcijska učinkovitost klasteriranog ( 5-HTTLPR / rs25531 ) bialelnog genotipskog modela (319).

Etničke razlike pripadnosti u frekvenciji alela ova dva funkcionalno povezana polimorfna lokusa *SLC6A4* gena detektirane su u različitim populacijama stanovništva diljem svijeta, pa je tako kod bijelaca u odnosu na neke azijske populacije zabilježena približno 40%-tna razlika za kratki *S* alel 5-HTTLPR-a dok je za  $L_G$  alel uočena frekvencija od 7–15% kod bijelaca i 24% kod Afroamerikanaca (305, 315, 319, 401).

Unatoč prisutnosti značajnih interpopulacijskih razlika, dugi *L* alel 5-HTTLPR polimorfno lokusa najzastupljeniji je kod Afrikanaca te bijelaca zapadnoeuropskog porijekla dok je kratki *S* alel najzastupljeniji u istočnoj Aziji.

Među bijelcima je učestalost najčešćeg dugog alela *L* oko 0,60%, a učestalost alela *S* oko 0,40% (309). Kod osoba Afričkog porijekla zabilježena je i forma dugog *XL* alela (402).

U ovom istraživanju kod niti jednog ispitanika nije detektiran *XL* alelna forma 5-HTTLPR polimorfne regije, a kao što je prethodno napomenuto, frekvencija genotipova i alelnih formi promotorske ( 5-HTTLPR i rs25531) regije *SLC6A4* gena u zdravoj



kontrolnoj skupini obuhvaćenoj ovom studijom u potpunom je skladu sa do sada objavljenim podacima za hrvatsku i druge populacije Europskog stanovništva (304-307, 348, 355-357, 369-370).

U ovoj studiji nije potvrđena povezanost 5-HTTLPR i rs25531 polimorfne regije *SLC6A4* gena s pojavom CD-a, ali je opažena tendenciju prema većim frekvencijama heterozigotnih 5-HTTLPR i rs25531 genotipskih formi (L/S,  $L_A/S$  i  $L'/S' = L_A/S + L_A/L_G$ ) u CD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Ovaj učinak molekularne heteroze (veća asocijacija heterozigotnih nositelja sa kvantitativnim ili dihotomnim karakteristikama u odnosu na nositelje homozigotnog genotipa) također je opisan u nekim drugim studijama 5-HTTLPR (383, 403-405).

Upotrebom Pearsonovog  $\chi^2$  testa statistički značajna razlika između subfenotipa CD-a klasificiranih prema Montrealskoj klasifikaciji (dob u početku bolesti, lokalizacija bolesti, ponašanje bolesti itd.) utvrđena je samo za 5-HTTLPR polimorfizam i klasterni bialelni model HTTLPR/rs25531 genotipa s obzirom na dob pri dijagnozi bolesti.

Pri tome su nositelji heterozigotnog (LS) genotipa bili pozitivno povezani sa A2 (17-41 godina) dobnom skupinom dok je klasterni bialelni genotip  $L'S'$  ( $L'/S' = L_A/S + L_A/L_G$ ; intermedijarna ekspresijska aktivnost) pokazao statistički značajnu povezanost sa A2 i A3 (>41 godina) dobnom skupinom CD bolesnika s tim da je u A2 skupini uočena njegova pozitivna, a u A3 skupini pacijenata negativna povezanost sa pojavnosću Crohnove bolesti.

No niti jedna od tih genotipskih formi 5-HTTLPR polimorfnog lokusa nije se pokazala statistički signifikantnom nakon primjene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe ( $P_c = 0.05/N$ ; N– broj analiziranih genotipova).

Isto niti jedna od provedenih analiza nije rezultirala statistički značajnom povezanošću alela i genotipskih formi 5-HTTLPR, i rs25531SNP-a između pojedinih kliničkih fenotipova Crohnove bolesti klasificiranim s obzirom na Montrealski konsenzus o

upalnim bolestima crijeva (ileokolon vs. ileum, luminalni vs. strikturirajući, perianalni vs. bez perianalne bolesti itd.).

Sikander i suradnici su u svom nedavno objavljenom radu ukazali na potencijalnu povezanost genotipskih varijanti *5-HTTLPR* polimorfne regije *SLC6A4* gena sa ulceroznim kolitisom i mikroskopskim kolitisom pri čemu je kod pacijenata sa mikroskopskim kolitisom te pacijenata sa ulceroznim kolitisom u remisiji detektirana značajno nižu učestalost nositelja *SS* genotipa u odnosu na grupirane nosioce *LL* i *LS* genotipa (*LL+SS*) što je bilo popraćeno značajno višom (*SS>LS>LL*) razinom serumskog serotonina (279, 280).

To je prvenstveno došlo do izražaja kod *SS* i *LS* nositelja u skupini pacijenata sa mikroskopskim kolitisom u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (279, 280). Isti fenomen veće ekspresije serumskog serotonina uočen je i kod *SS* nositelja u skupini CD pacijenti u remisiji u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika sa istim genotipom (279, 280).

Nasuprot tome u njihovoj studiji, slično rezultatima naše studije na CD pacijentima, nije opažena statistički značajnu razliku u distribuciji alela i genotipova *5-HTTLPR* lokusa između UC pacijenata sa aktivnom bolešću i zdravih kontrolnih ispitanika ili između ženske podskupine UC pacijenata i ženskih kontrolnih ispitanika (279, 280). Slično tome, Shiotani i suradnici također nisu detektirali statistički značajnu povezanost *5-HTTLPR* varijanti i ulceroznog kolitisa (362).

Za razliku od Sikandera i suradnika u ovoj studiji uočena je veća, premda statistički nesignifikantna, distribucija *SS* genotipa u cjelokupnoj (muškarci+žene) i ženskoj podskupini CD pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike.

Slično rezultatima ove studije Shajib i suradnici su analizom 40 CD pacijenata i jednakog broja zdravih kontrolnih ispitanika također detektirali veću učestalost nositelja *S*-genotipa (*LS+SS nasuprot LL*) kod CD pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike s tom razlikom da je u njihovoj studiji ta razlika bila statistički značajna (282).

Primijećene razlike u distribuciji *SS* genotipova mogu biti rezultat heterogene pozadine CD-a i drugih oblika IBD-a i / ili etničkih ili regionalnih razlika između ispitivanih skupina.

One su također su u skladu s ranije spomenutom hipotezom da *5-HTTLPR* može predstavljati samo jedan od polimorfnih lokusa odgovornih za pojavu različitih formi upalnih bolesti crijeva.

U radu Shajiba i suradnika također je potvrđena i statistički značajno veća koncentracija serotonina u krvnoj plazmi te PPP (engl. *platelet pure plasma*) plazmi CD pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (282).

Statistički značajno veća koncentracija serotonina detektirana je i u PPP plazmi CD pacijenata sa *S*-genotipom (*LS+SS*) u odnosu na kontrolne ispitanike sa *LL* i *S*-genotipom (282).

Nažalost u ovom radu nije izvršena analiza serumskog serotonina te stoga nije bilo moguće procijeniti učinak pojedinih genotipskih varijanti *SLC6A4* gena na funkcionalnost SERT proteina.

Minderhoud i suradnici su 2007 detektirali značajne regionalne razlike u mRNA ekspresiji *SLC6A4* gena uz statistički značajniju ekspresiju SERT proteina u sluznici ileuma u odnosu na kolon CD pacijenata u remisiji bolesti (275). Woytal i suradnici također su izvijestili o porastu razine mRNA *SLC6A4* gena u ileumu bolesnika s CD i UC, dok su njegove razine mRNA u debelom crijevu bile ispod granice detekcije (285).

Slično tome, Tada i suradnici su također detektirali statistički značajno manju ekspresiju SERT proteina u upaljenoj sluznici UC pacijenata u odnosu na sluznicu u zacjeljivanju te smanjenje SERT ekspresije u zacjeljujućoj sluznici kolona u kojoj je još vidljiva prisutnost niskog stupnja upalne reakcije (blago povećana ekspresija proupalnih gena) (241).

Statistički značajna redukcija *SLC6A4* mRNA te smanjena imunoreaktivnost na SERT protein u epitelnim stanicama UC, IBS-C i IBS-D pacijenata u odnosu na kontrolu

zabilježena je i u radu Coates-a i suradnika s tom razlikom da je u odnosu na smanjeni broj enterokromafinih stanica u težem stupnju UC-a njihov broj ostao nepromijenjen kod IBS-C i IBS-D pacijenata (273). Nasuprot tome Faure i suradnici detektirali su smanjenu ekspresiju SERT proteina u upaljenoj sluznici kolona pedijatrijskih IBS pacijenata (406).

O značajnim razlikama u ekspresiji SERT proteina između različitih regija gastrointestinalnog trakta (duodenum, ileum, uzlazni kolon, transverzum i silazni kolon) s prevladavajućom ekspresijom u ileumu i odsutnošću njegove ekspresije u debelom crijevu također su izvijestili Meier i suradnici (294). No kod niti jednog od njihovih ispitanika nije dijagnosticiran UC ili drugi oblici upalnih bolesti crijeva kao ni vidljivi simptomi drugih crijevnih oboljenja (294).

Gill i suradnici su također izvijestili o diferencijacijskoj ekspresiji SERT proteina duž uzdužne osi (ileum >> dvanaesnik >> jejunum) ljudskog crijeva (328). Ekspresija mRNA i imunološka neaktivnost na SERT protein u njihovoj su studiji uglavnom otkriveni u epitelnim stanicama duodenuma i ileuma uz najveću razinu u ileumu, relativno vrlo niskom razinom u jejunumu i gotovo odsutnom (vrlo slaba imunološka reakcija u proksimalnom dijelu kolona) u debelom crijevu (328).

S obzirom na moguću povezanost 5-HTTLPR polimorfizma sa IBS-om do sada objavljeni rezultati su poprilično kontradiktorni čak i unutar istih populacija.

Najnovija meta analiza provedenih studija u cjelokupnom uzorku nije detektirala statistički značajnu povezanost između 5-HTTLPR i IBS-a dok je pri analizi kliničkih podskupina IBS-a i te pojedinih etničkih grupa LL genotip indiciran kao rizični čimbenik za pojavu IBS-C-a (336, 407, 408).

Što se tiče rs25531 SNP polimorfizma, do sada su objavljene samo dvije studije koje su ispitivale njegovu povezanost s IBS-om, a samo jedna je izvijestilo o pozitivnoj povezanosti s pojavom bolesti s tri puta većim omjerom vjerojatnosti (OR) za pojavu alela  $L_G$  alela u bolesnika s IBS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika (376, 377).

U ovoj studiji nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između CD pacijenata i kontrolne skupine ispitanika kao ni povezanost alela i genotipskih formi rs25531 SNP-a sa kliničkim fenotipovima Crohnove bolesti.

Zaključno, ovom studijom utvrđene su statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova *STin2 VNTR* regije *SLC6A4* gena između CD bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika.

Osim toga utvrđena je negativna povezanost bialelne *ss* genotipske varijante *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena te pozitivna povezanost *S12* haplotipa s pojavnošću Crohnove bolesti.

Prikazani rezultati ukazuju na potencijalno važan doprinos *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena u patogenezi Crohnove bolesti.

## **7. ZAKLJUČAK**

- Ovim istraživanjem potvrdili smo ulogu *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena u patogenezi Crohnove bolesti
- Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena između CD i HC skupine ispitanika te između ženske podskupine pacijenata u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu ispitanika.
- Utvrđena je statistički značajna negativna povezanost bialelne *ss* ( $s = STin2\ 10$  ili  $STin2\ 9$ ) genotipske forme *STin2 VNTR* lokusa sa pojavnošću CD-a.
- Utvrđena je statistički značajno veća zastupljenost *S-STin2.12* (*5-HTTLPR/rs25531: S-STin2: STin2.12*) haplotipa u CD skupini ispitanika.
- Nije utvrđena statistički značajna povezanost alelnih i genotipskih formi *5-HTTLPR* i *rs25531 SNP* polimorfne regije *SLC6A4* gena sa CD-om kao ni razlika u njihovoj distribuciji između različitih fenotipskih formi Crohnove bolesti klasificiranih prema Montrealskom konsenzusu.
- Zaključno, prikazani rezultati ukazuju na potencijalno važan doprinos *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena u patogenezi Crohnove bolesti.

## **8. SAŽETAK**



U ovoj retrospektivnoj case-control studiji izvršena je analiza povezanosti alelnih i genotipskih formi promotorske (*5-HTTLPR* i *rs25531*) i *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena sa pojavnošću Crohnove bolesti (CD). Istraživanjem je obuhvaćeno 192 CD pacijenata i 157 zdravih kontrolnih (HC) ispitanika (po dobi i spolu ujednačenih sa skupinom pacijenata). Genotipizacija ispitanika izvršena je lančanom reakcijom polimeraze a korelacija polimorfnih varijanti *SLC6A4* gena sa kliničkim i fenotipskim karakteristikama ispitanika analizirana je primjenom  $\chi^2$  odnosno Fisherovog egzaktnog testa, univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijom te analizom haplotipova. Rezultati su potvrdili podjednaku spolnu (CD: 88 (45.8%) žene, 104 (54.2%) muškarci; HC: 84 (53.5%) žene, 73 (46.5%) muškarci;  $\chi^2 = 2.03$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.154$ ) i starosnu (CD:  $41.34 \pm 12.789$ ; HC:  $41.68 \pm 8.789$ ;  $P = 0.091$ ) distribuciju unutar CD i HC skupine ispitanika. Statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između CD i HC te između ženske podskupine pacijenata u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu ispitanika utvrđena je za *STin2 VNTR* polimorfnu regiju *SLC6A4* gena [distribucija genotipova (CD  $\chi^2 = 12.03$ ;  $df = 2$ ,  $P = 0.002$ ; žene:  $\chi^2 = 9.85$ ,  $df = 2$ ;  $P = 0.007$ ); distribucija alela (CD:  $\chi^2 = 12.03$ ;  $df = 2$ ,  $P = 0.002$ ; žene:  $\chi^2 = 9.85$ ,  $df = 2$ ;  $P = 0.007$ )]. Utvrđena je statistički značajna negativna povezanost bialelne *ss* ( $s = STin2 10$  ili *STin2 9*) genotipske forme *STin2 VNTR* lokusa [CD:  $P = 0.013$ , OR (prilagođeno po dobi i spolu) = 0.5, 95% CI=0.29-0.86; žene:  $P = 0.006$ , OR (prilagođeno po dobi) = 0.32, 95% CI=0.14-0.72] sa pojavnošću CD-a te statistički značajno veća zastupljenost *S-STin2.12* (*5-HTTLPR/rs25531*: *S-STin2*: *STin2.12*) haplotipa u CD skupini ispitanika ( $P = 0.004$ , OR=1.62, 95 % CI=1.16-2.26). Nije utvrđena statistički značajna povezanost alelnih i genotipskih formi *5-HTTLPR* i *rs25531 SNP* polimorfne regije *SLC6A4* gena sa CD-om kao ni razlika u njihovoj distribuciji između različitih fenotipskih formi Crohnove bolesti klasificiranih prema Montrealskom konsenzusu. Zaključno, prikazani rezultati ukazuju na potencijalno važan doprinos *STin2 VNTR* polimorfne regije *SLC6A4* gena u patogenezi Crohnove bolesti.

**Ključne riječi:** transporter za povratni unos serotonina, 5-HT, SERT, SLC6A4, 5-HTTLPR, rs25531, STin2 VNTR, Crohnova bolest.

## **9. SUMMARY**

In this retrospective case-control study we analyzed the potential association of the promoter (5-HTTLPR and rs25531) and intronic *Stin2* VNTR polymorphic regions of the *SLC6A4* gene with the incidence of Crohn's disease (CD). The study included 192 CD patients and 157 healthy control subjects (age and gender matched with patients group). Genotyping was performed by polymerase chain reaction and correlation of polymorphic *SLC6A4* gene variants with CD and its clinical subtypes was analyzed by chi-square and Fisher's exact test, binary logistic regression and haplotype analysis. The results confirmed similar gender (CD: 88 (45.8%) female, 104 (54.2%) male; HC: 84 (53.5%) female, 73 (46.5%) male;  $\chi^2 = 2.03$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.154$ ) and age (CD:  $41.34 \pm 12.789$ ; HC:  $41.68 \pm 8.789$ ;  $P = 0.091$ ) distribution among CD and HC groups involved in the study. Significant difference was observed in *STin2* genotype (CD:  $\chi^2 = 15.86$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.003$ ; females:  $\chi^2 = 15.33$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.004$ ) and allele (CD:  $\chi^2 = 12.03$ ;  $df = 2$ ,  $P = 0.002$ ; females:  $\chi^2 = 9.85$ ,  $df = 2$ ;  $P = 0.007$ ) distribution between CD and HC and between corresponding female subgroups, with significant negative association (CD:  $P = 0.013$ , OR adjusted by age and gender = 0.5, 95% CI=0.29-0.86; females:  $P = 0.006$ , OR adjusted by age = 0.32, 95% CI=0.14-0.72) of biallelic ss (*STin2.9* and *Stin2.10*) *STin2* genotype with CD, and significantly higher S-*STin2.12* (5-HTTLPR/rs25531: S-*STin2.12*) haplotype distribution ( $P = 0.004$ , OR=1.62, 95% CI=1.16-2.26) in CD. There was no significant association between 5-HTTLPR and rs25531 genotype or allele frequencies and CD or between any *SLC6A4* polymorphic loci among different clinical subtypes of Crohn's disease classified according to Montreal consensus. In conclusion, *STin2* VNTR polymorphism of *SLC6A4* gene may contribute to the pathogenesis of CD.

**Key words:** serotonin re-uptake transporter, 5-HTT, SERT, *SLC6A4*, 5-HTTLPR, rs25531, *STin2* VNTR, Crohn's disease

## **10. LITERATURA**

1. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:79-94.
2. Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg.* 2017;26:349-355.
3. Vucelic B. Inflammatory bowel diseases: controversies in the use of diagnostic procedures. *Dig Dis.* 2009;27:269-277.
4. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon.* 2018;64:20-57.
5. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:1553-1563.
6. Louis E, Van Kemseke C, Reenaers C. Necessity of phenotypic classification of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25 Suppl 1:S2-7.
7. Sachar DB, Walfish A. Inflammatory bowel disease: one or two diseases? *Curr Gastroenterol Rep.* 2013;15:298.
8. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5A-36A
9. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al.; IBD guidelines eDelphi consensus group, Gaya DR, Iqbal TH, Taylor SA, Smith M, Brookes M, Hansen R, Hawthorne AB. British Society of Gastroenterology

- consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(Suppl 3):s1-s106.
10. Tremaine WJ. Review article: Indeterminate colitis--definition, diagnosis and management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25:13-17.
  11. Price AB. Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol* 1978;31:567-577.
  12. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 2004;57:1233-1244.
  13. Geboes K, Van Eyken P. Inflammatory bowel disease unclassified and indeterminate colitis: the role of the pathologist. *J Clin Pathol*. 2009;62:201-205.
  14. Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2014;147:990-1007.e3.
  15. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al.; European Society of Pathology (ESP); European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:827-851.
  16. DeRoche TC, Xiao SY, Liu X. Histological evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2014;2:178-192.
  17. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7:235-241.
  18. Vucelic B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus* 2006; 15(1):53-62.
  19. Vucelić B, Cuković-Cavka S, Banić M, Bilić A, Borzan V, Duvnjak M, et al. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom. *Acta Med Croatica* 2013; 67:75-87.
  20. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: Vucelić B i sur. ur. *Gastroenterologija i hepatologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 723-760.

21. Pai RK, Jairath V, Vande Casteele N, Rieder F, Parker CE, Lauwers GY. The emerging role of histologic disease activity assessment in ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc.* 2018;88:887-898.
22. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, et al.; European Society of Pathology; European Crohn's and Colitis Foundation. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch.* 2014;464(5):511-527.
23. Ricart E., Sandborn W.J. (2003) Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. In: Cohen R.D. (eds) *Inflammatory Bowel Disease. Clinical Gastroenterology.* Humana Press, Totowa, NJ.
24. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006;55:749–753
25. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1314-1321.
26. Hyams JS. Standardized recording of parameters related to the natural history of inflammatory bowel disease: from Montreal to Paris. *Dig Dis.* 2014;32:337-344.
27. Park SH, Yang SK, Park SK, Kim JW, Yang DH, Jung KW, et al. Atypical distribution of inflammation in newly diagnosed ulcerative colitis is not rare. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014;28:125–130.
28. Bernstein CN, Shanahan F, Anton PA, Weinstein WM. Endoscopic and histological patchiness in treated ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3258–3262.
29. Odze R, Antonioli D, Peppercorn M, Goldman H. Effect of topical 5-aminosalicylic acid (5-ASA) therapy on rectal mucosal biopsy morphology in chronic ulcerative colitis. *Am J Surg Pathol* 1993;17:869–875.

30. Abdelrazeq AS, Wilson TR, Leitch DL, Lund JN, Leveson SH. Ileitis in ulcerative colitis: is it a backwash? *Dis Colon Rectum* 2005;48:2038–2046.
31. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135:1114–1122.
32. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;107:3–11.
33. Fumery M, Singh S, Dulai PS, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Sandborn WJ. Natural history of adult ulcerative colitis in population-based cohorts: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:343–356.
34. Hyams J, Davis P, Lerer T, Colletti RB, Bousvaros A, Leichtner A, et al. Clinical outcome of ulcerative proctitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;25:149–152.
35. Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci* 1993;38:1137-1146.
36. Powell-Tuck J, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. The prognosis of idiopathic proctitis. *Scand J Gastroenterol* 1977;12:727-732.
37. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Nielsen OH, Binder V. Changes in extent of ulcerative colitis: A study on the course and prognostic factors. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:260-266.
38. Ayres RC, Gillen CD, Walmsley RS, Allan RN. Progression of ulcerative proctosigmoiditis: Incidence and factors influencing progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:555-558.
39. Meucci G, Vecchi M, Astegiano M, Beretta L, Cesari P, Dizioli P, et al. The natural history of ulcerative proctitis: A multicenter, retrospective study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:469-473.



40. Moum B, Ekbohm A, Vatn MH, Elgjo K. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1564-1569.
41. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Sauar J, Kjellevold Ø, Schulz T, et al. Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:543–550.
42. Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, et al.; IBSEN Study Group. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(4):431-440.
43. Moum B, Ekbohm A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, et al. Clinical course during the 1st year after diagnosis in ulcerative colitis and Crohn's disease – results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990-93. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1005-1012.
44. Ritchie JK, Powell-Tuck J, Lennard-Jones JE. Clinical outcome of the first ten years of ulcerative colitis and proctitis. *Lancet* 1978;1:1140-1143.
45. Lennard-Jones JE. The clinical outcome of ulcerative colitis depends on how much of the colonic mucosa is involved. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1983;88:48-53.
46. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:1444-1451.
47. Devroede GJ, Taylor WF, Sauer WG, Jackman RJ, Stickler GB. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1971;285:17-21.
48. Mir-Madjlessi SH, Farmer RG, Easley KA, Beck GJ. Colorectal and extracolonic malignancy in ulcerative colitis. *Cancer* 1986;58:1569-1574.

49. Brostrom O, Monsen U, Nordenwall B, Sorstad J, Hellers G. Prognosis and mortality of ulcerative colitis in Stockholm County, 1955-1979. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:907-913.
50. Gilat T, Fireman Z, Grossman A, Hacoheh D, Kadish U, Ron E, et al. Colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. A population study in central Israel. *Gastroenterology* 1988;94:870-877.
51. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990;323:1228-1233.
52. Stewenius J, Adnerhill I, Anderson H, Ekelund GR, Florén CH, Fork FT, et al. Incidence of colorectal cancer and all cause mortality in non-selected patients with ulcerative colitis and indeterminate colitis in Malmo, Sweden. *Int J Colorectal Dis* 1995;10:117-122.
53. Ekbom A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L, Adami HO. Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology* 1992;103:954-960.
54. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V. Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: Follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology* 2003;125:1576-1582.
55. Probert CS, Jayanthi V, Wicks AC, Mayberry JF. Mortality in patients with ulcerative colitis in Leicestershire, 1972-1989. An epidemiological study. *Dig Dis Sci* 1993;38:538-541.
56. Farrokhyar F, Swarbrick ET, Grace RH, Hellier MD, Gent AE, Irvine EJ. Low mortality in ulcerative colitis and Crohn's disease in three regional centers in England. *Am J Gastroenterol* 2001;96:501-507.
57. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Tech Coloproctol*. 2019;23(1):3-13.
58. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: Final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2:1041-108.

59. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1371-1385.
60. Katičić M. Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva. *Acta Med Croatica*, 2013; 67:93-110.
61. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus and implications. *Gut* 2006; 55: 749-753.
62. Levine A, Otley AR, Mack D, Hyams J, de Bruijne J, Uusoue K, et al. Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology*. 2007;133:423–432.
63. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132:763-786.
64. Mohammed Vashist N, Samaan M, Mosli MH, Parker CE, MacDonald JK, et al. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;1:CD011450.
65. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis et al. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;5:CD011256.
66. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al.; IBD Section of the British Society of Gastroenterology.. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011;60:571–607.
67. Feakins RM; British Society of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. *J Clin Pathol*. 2013;66(12):1005-1026.
68. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology*. 1975;68(4 Pt 1):627-635.

69. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, et al. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut*. 1988 May;29(5):588-592.
70. Aeberhard P, Berchtold W, Riedtmann HJ, Stadelmann G. Surgical recurrence of perforating and nonperforating Crohn's disease. A study of 101 surgically treated Patients. *Dis Colon Rectum*. 1996 Jan;39(1):80-87.
71. Gilberts EC, Greenstein AJ, Katsel P, Harpaz N, Greenstein RJ. Molecular evidence for two forms of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:127214.
72. Sachar DB, Andrews HA, Farmer RG, Pallone F, Penn AS, Prantera C, et al. Proposed classification of patient subgroups in Crohn's disease. *Gastroenterol Int* 1992; 5: 141-154.
73. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15.
74. Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):467-471.
75. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-1605.
76. Paolo Gionchetti, Axel Dignass, Silvio Danese, Fernando José Magro Dias, Gerhard Rogler, et al, on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(1):3-25.
77. Duricova D, Burisch J, Jess T, Gower-Rousseau C, Lakatos PL; ECCO-EpiCom. Age-related differences in presentation and course of inflammatory bowel disease: an update on the population-based literature. *J Crohns Colitis*. 2014;8(11):1351-1361.

78. Gower-Rousseau C, Vasseur F, Fumery M, Savoye G, Salleron J, Dauchet L, et al. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). *Dig Liver Dis.* 2013;45(2):89-94.
79. Al-Bawardy B, Hansel SL, Fidler JL, Barlow JM, Bruining DH. Endoscopic and Radiographic Assessment of Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(3):493-513.
80. Chen M, Shen B. Endoscopic Therapy in Crohn's Disease: Principle, Preparation, and Technique. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(9):2222-2240.
81. Bataille F, Klebl F, Rümmele P, Schroeder J, Farkas S, Wild PJ, et al. Morphological characterisation of Crohn's disease fistulae. *Gut.* 2004; 53(9): 1314–1321.
82. Wilkins T, Jarvis K, Patel J. Diagnosis and management of Crohn's disease. *Am Fam Physician.* 2011;84(12):1365-1375.
83. Mazza M , Giovanna CM, Cappello M. Clinical Presentation of Crohn's Disease. In: Giuseppe Lo Re, Massimo Midiri, editors. *Crohn's Disease: Radiological Features and Clinical-Surgical Correlations.* Springer International Publishing Switzerland 2016.
84. Morreale CG, Cappello M, Craxì A. Laboratory Tests in Crohn's Disease. In: Giuseppe Lo Re, Massimo Midiri, editors. *Crohn's Disease: Radiological Features and Clinical-Surgical Correlations.* Springer International Publishing Switzerland 2016.
85. Cocorullo CG, Falco N, Fontana T, Tutino R, Bonventere S, D'Arpa F et al. Diagnostic and Therapeutic Role of Endoscopy in Crohn's Disease. In: Giuseppe Lo Re, Massimo Midiri, editors. *Crohn's Disease: Radiological Features and Clinical-Surgical Correlations.* Springer International Publishing Switzerland 2016.

86. Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, et al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(3):348-354.e17.
87. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976; 70: 439-444.
88. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1: 514.
89. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of Crohn disease with 6 mercaptopurine, A long-term randomized double-blind study. *N Engl J Med* 1980; 302: 981-987.
90. Wright JP, Marks IN, Parfitt A. A simple clinical index of Crohn's disease activity – The Cape town index. *S Afr Med J* 1985; 68: 902-903.
91. Myren J, Bouchier IA, Watkinson G, Softley A, Clamp SE, de Dombal FT. The O.M.G.E. Multinational Inflammatory Survey 1976-1982. A further report on 2657 cases. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984; 95: 1-27.
92. van Hees PA, van Elteren PH, van Lier HJ, van Tongeren JH. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 279-86.
93. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20: 27-32.
94. Ricart E, Sandborn WJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405.
95. Naber AH, de Jong DJ. Assessment of disease activity in inflammatory bowel disease; relevance for clinical trials. *Neth J Med*. 2003;61(4):105-110.

96. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, et al. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:804–810.
97. Irvine EJ. Development and subsequent refinement of the inflammatory bowel disease questionnaire: a quality-of-life instrument for adult patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:S23–S27.
98. Love JR, Irvine EJ, Fedorak RN. Quality of life in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1992;14:15–19.
99. Hlavaty T, Persoons P, Vermeire S, Ferrante M, Pierik M, Van Assche G, et al. Evaluation of shortterm responsiveness and cutoff values of inflammatory bowel disease questionnaire in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:199–204.
100. Huaman JW, Casellas F, Borruel N, Peláez A, Torrejón A, Castells I, et al. Cutoff values of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire to predict a normal health related quality of life. *J Crohns Colitis* 2010;4:637–641.
101. Clara I, Lix LM, Walker JR, Graff LA, Miller N, Rogala L, et al. The Manitoba IBD Index: evidence for a new and simple indicator of IBD activity. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1754–1763.
102. Surti B, Spiegel B, Ippoliti A, Vasiliauskas EA, Simpson P, Shih DQ, et al. Assessing health status in inflammatory bowel disease using a novel single-item numeric rating scale. *Dig Dis Sci* 2013;58:1313–1321.
103. Bodger K, Ormerod C, Shackcloth D, Harrison M; IBD Control Collaborative.. Development and validation of a rapid, generic measure of disease control from the patient's perspective: the IBD-control questionnaire. *Gut* 2014;63:1092–1102.
104. Khanna R, Levesque BG, Sandborn WJ. IBD: Measuring what counts—endoscopic assessment in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:9–10.
105. Khanna R, Bouguen G, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Dubcenco E, et al. A systematic review of measurement of endoscopic disease activity and

- mucosal healing in Crohn's disease: recommendations for clinical trial design. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1850–1861.
106. Khanna R, Nelson SA, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Zou GY, et al. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;(8):CD010642.
  107. Al-Bawardy B, Hansel SL, Fidler JL, Barlow JM, Bruining DH. Endoscopic and Radiographic Assessment of Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(3):493-513.
  108. Gralnek IM, Defranchis R, Seidman E, Leighton JA, Legnani P, Lewis BS. Development of a capsule endoscopy scoring index for small bowel mucosal inflammatory change. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(2):146-154.
  109. Niv Y, Ilani S, Levi Z, Hershkowitz M, Niv E, Fireman Z, et al. Validation of the Capsule Endoscopy Crohn's Disease Activity Index (CECDAI or Niv score): a multicenter prospective study. *Endoscopy*. 2012;44(1):21-26.
  110. Chamouard P, Richert Z, Meyer N, Rahmi G, Baumann R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:882–887.
  111. Karoui S, Ouerdiane S, Serghini M, Jomni T, Kallel L, Fekih M, et al. Correlation between levels of C-reactive protein and clinical activity in Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2007;39:1006–1010.
  112. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:40–46.
  113. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Vavricka SR, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010;105:162–169.



114. Bjorkesten CG, Nieminen U, Turunen U, Arkkila P, Sipponen T, Färkkilä M. Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:528–537.
115. Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Cotte E, Peyras J, Cuerq C, et al. Neopterin is a novel reliable fecal marker as accurate as calprotectin for predicting endoscopic disease activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1043–1052.
116. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:2218–2224.
117. Deepak P, Kolbe AB, Fidler JL, Fletcher JG, Knudsen JM, Bruining DH. Update on Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound Evaluation of Crohn's Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2016;12(4):226-236.
118. Walsh AJ, Bryant RV, Travis SP. Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(10):567-579.
119. D'Inca R, Caccaro R. Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:151-161.
120. Novak G, Parker CE, Pai RK, MacDonald JK, Feagan BG, Sandborn WJ, et al. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;7:CD012351.
121. Mojtahed A, Khanna R, Sandborn WJ, D Haens GR, Feagan BG, Shackelton LM, et al. Assessment of histologic disease activity in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Diseases* 2014;20(11):2092–2103.
122. Arnott ID, Watts D, Ghosh S. Review article: is clinical remission the optimum therapeutic goal in the treatment of Crohn's disease?. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2002;16(5):857–867.

123. Hommes D, Colombel JF, Emery P, Greco M, Sandborn WJ. Changing Crohn's disease management: need for new goals and indices to prevent disability and improve quality of life. *Journal of Crohn's and Colitis* 2012;6:S224–234.
124. Korelitz BI, Sommers SC. Response to drug therapy in Crohn's disease: evaluation by rectal biopsy and mucosal cell counts. *Journal of Clinical Gastroenterology* 1984;6(2):123–128.
125. Molander P, Sipponen T, Kemppainen H, Jussila A, Blomster T, Koskela R, et al. Achievement of deep remission during scheduled maintenance therapy with TNF  $\alpha$ - blocking agents in IBD. *Journal of Crohn's and Colitis* 2013;7(9):730–735.
126. De Dombal FT. Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, natural history and local complications. *Postgrad Med J*. 1968;44(515):684-692.
127. Lim ML, Wallace MR. Infectious diarrhea in history. *Infect Dis Clin North Am* 2004;18:261–274.
128. Mulder DJ, Noble AJ, Justinich CJ, Duffin JM. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2014;8(5):341-348.
129. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol*. 2001;7(2):175-184.
130. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.
131. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-2778.

132. Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M, Cvalínová D, Štych P, Schwarz J. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018;24(25):2741-2763.
133. Jovanovic Z. Epidemiology of Crohn's disease in the Rijeka-Istra region [in Croatian]. *Lijec Vjesn* 1999;121:8–13.
134. Sincić BM, Vucelić B, Persić M, Brncić N, Erzen DJ, Radaković B, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(4): 437-444.
135. Pezerovic D, Klarin I, Zulj M, Majnaric L, Khaznadar E, Vcev A. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Vukovarsko-Srijemska County, Croatia, 1991-2000 and 2001-2010: A population-based study. *Collegium Antropologicum* 2014; 38(1): 115-123.
136. Klarin I, Majnaric L, Jovanovic Z, Nakic D, Vcev I, Vcev A. Epidemiology and clinical presentation of inflammatory bowel disease in Zadar County, Croatia. *Collegium antropologicum* 2013; 37(4): 1161-1170.
137. Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980–1989 et al. Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980–1989. *Int J Epidemiol* 1991;20:1043–1047.
138. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. EpiCom-group. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: The ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 2014; 63(4): 588-97.
139. Despalatović BR, Bratanić A, Radić M, Jurišić Z, Tonkić A. Epidemiological trends of inflammatory bowel disease (IBD) in Split-Dalmatia County, Croatia from 2006 to 2014. *Eur J Intern Med*. 2017;46:e17-e19.
140. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2017;152(2):313-321.e2.

141. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-317.
142. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:39-49.
143. Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:497-511.
144. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427-434.
145. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(1):13-27.
146. Maaser C, Langholz E, Gordon H, Burisch J, Ellul P, Ramirez VH, et al. European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Environmental Factors in IBD. *J Crohns Colitis*. 2017;11(8):905-920.
147. Rogler G, Zeitz J, Biedermann L. The Search for Causative Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis*. 2016;34 Suppl 1:48-55.
148. van der Sloot KWJ, Amini M, Peters V, Dijkstra G, Alizadeh BZ. Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(9):1499-1509.
149. Man SM, Kaakoush NO, Mitchell HM. The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(3):152-68.
150. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(10):573-584.
151. Huang H, Fang M, Jostins L, Umićević Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, et al.; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Weersma RK, Duerr RH, Mathew CG, Rioux JD, McGovern DPB, Cho JH,

- Georges M, Daly MJ, Barrett JC. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature*. 2017 Jul 13;547(7662):173-178.
152. Uniken Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol*. 2017;241(2):146–158.
153. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12296–12310.
154. Uhlig HH, Muise AM. Clinical Genomics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Genet*. 2017;33(9):629–641.
155. Gordon H, Trier Moller F, Andersen V, Harbord M. Heritability in inflammatory bowel disease: from the first twin study to genome-wide association studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1428–1434.
156. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*. 2011;60(12):1739–1753.
157. Connelly TM, Berg AS, Harris L 3rd, Brinton D, Deiling S, Koltun WA. Genetic determinants associated with early age of diagnosis of IBD. *Dis Colon Rectum*. 2015;58(3):321–327.
158. Ellinghaus D, Bethune J, Petersen BS, Franke A. The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis--status quo and beyond. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(1):13–23.
159. Cleyneen I, González JR, Figueroa C, Franke A, McGovern D, Bortlík M, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut*. 2013;62(11):1556-1565.
160. Kevans D, Silverberg MS, Borowski K, Griffiths A, Xu W, Onay V, et al. IBD Genetic Risk Profile in Healthy First-Degree Relatives of Crohn's Disease Patients. *J Crohns Colitis*. 2016;10(2):209–215.

161. Michail S, Bultron G, Depaolo RW. Genetic variants associated with Crohn's disease. *Appl Clin Genet*. 2013;6:25–32.
162. Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(3):373–386.
163. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K Family and twin studies in inflammatory bowel disease.. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun 21; 12(23):3668-72.
164. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996;379(6568):821-823.
165. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.
166. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-606.
167. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):867-874.
168. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(4):294-303.
169. Sun Y, Li L, Xie R, Wang B, Jiang K, Cao H. Stress Triggers Flare of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adults. *Front Pediatr*. 2019;7:432.
170. Oligschlaeger Y, Yadati T, Houben T, Condello Oliván CM, Shiri-Sverdlov R. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed "Gut/Feeling". *Cells*. 2019;8(7):659.

171. Bernstein CN. The Brain-Gut Axis and Stress in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(4):839–846.
172. Brzozowski B, Mazur-Bialy A, Pajdo R, Kwiecien S, Bilski J, Zwolinska-Wcislo M, et al. Mechanisms by which Stress Affects the Experimental and Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(8):892-900.
173. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2013;144(1):36–49.
174. Selivanova LS, Tertychnyy AS. The role of the neuroendocrine system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2016;12(12):92–96.
175. Frolkis AD, Vallerand IA, Shaheen AA, Lowerison MW, Swain MG, Barnabe C, et al. Depression increases the risk of inflammatory bowel disease, which may be mitigated by the use of antidepressants in the treatment of depression. *Gut.* 2019;68(9):1606-1612.
176. Maunder RG, Levenstein S. The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med.* 2008;8(4):247–252.
177. Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:250–257.
178. Sharkey KA, Mawe GM. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2(6):669–677.
179. Kraneveld AD, Rijniere A, Nijkamp FP, Garssen J. Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2-3):361–374.
180. Margolis KG, Gershon MD. Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends Neurosci.* 2016;39(9):614–624.

181. Stasi C, Orlandelli E. Role of the brain-gut axis in the pathophysiology of Crohn's disease. *Dig Dis*. 2008;26(2):156–166.
182. Mittal R, Debs LH, Patel AP, Nguyen D, Patel K, O'Connor G, et al. Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *J Cell Physiol*. 2017;232(9):2359-2372.
183. Reber SO. Stress and animal models of inflammatory bowel disease--an update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(1):1-19.
184. El-Salhy M, Solomon T, Hausken T, Gilja OH, Hatlebakk JG. Gastrointestinal neuroendocrine peptides/amines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(28):5068–5085.
185. Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*. 1997;40(6):767–774.
186. Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(1):19–27.
187. Magro F, Vieira-Coelho MA, Fraga S, Serrão MP, Veloso FT, Ribeiro T, et al. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2002;47(1):216-224.
188. Khalil M, Zhang Z, Engel MA. Neuro-Immune Networks in Gastrointestinal Disorders. *Visc Med*. 2019;35(1):52-60.
189. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol*. 2014;817:195-219.
190. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*. 2012;46(6):261-274.



191. Brinkman DJ, Ten Hove AS, Vervoordeldonk MJ, Luyer MD, de Jonge WJ. Neuroimmune Interactions in the Gut and Their Significance for Intestinal Immunity. *Cells*. 2019;8(7). pii: E670.
192. Bernardazzi C, Pêgo B, de Souza HS. Neuroimmunomodulation in the Gut: Focus on Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1363818.
193. Terry N, and Margolis KG. Serotonergic mechanisms regulating the GI tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handb Exp Pharmacol*. 2017; 239: 319-342.
194. Margolis KG, Gershon MD. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(6):503-511.
195. Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*. 1997;40(6):767-774.
196. Molderings GJ. Physiological, pathophysiological and therapeutic impact of the enteric serotonergic system. *Arzneimittelforschung*. 2012;62(4):157-166.
197. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473-486.
198. Spohn SN, Mawe GM. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):412-420.
199. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res*. 2015;277:32-48.
200. Linan-Rico A, Ochoa-Cortes F, Beyder A, Soghomonyan S, Zuleta-Alarcon A, Coppola V, et al. Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. *Front Neurosci*. 2016;10:564.

201. Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(1):19-27.
202. Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(3):561-574.
203. Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(10):2698-2709.
204. Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(1):14–21.
205. Kaunitz J, Nayyar P. Bugs, genes, fatty acids, and serotonin: Unraveling inflammatory bowel disease?. *F1000Res*. 2015;4:F1000 Faculty Rev-1146.
206. Spiller R. Serotonin and GI clinical disorders. *Neuropharmacology*. 2008;55(6):1072–1080.
207. De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 19;115(25):6458-6463.
208. Khan WI. The Role of 5-HT Dysregulation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013;9(4):259–261.
209. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397–414.
210. Manocha M, Khan WI. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. *Clin Transl Gastroenterol*. 2012;3(4):e13.
211. Gershon MD. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2012;123:268–280.

212. Bertrand PP, Bertrand RL. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*. 2010;153(1-2):47–57.
213. Chin A, Svejda B, Gustafsson BI, Granlund AB, Sandvik AK, Timberlake A, et al. The role of mechanical forces and adenosine in the regulation of intestinal enterochromaffin cell serotonin secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(3):G397-405.
214. Linan-Rico A, Ochoa-Cortes F, Beyder A, Soghomonyan S, Zuleta-Alarcon A, Coppola V, et al. Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. *Front Neurosci*. 2016;10:564.
215. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:48.
216. Spiller R. Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19 Suppl 2:25–31.
217. Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20 Suppl 7:3–14.
218. El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett*. 2015;589(15):1728-1734.
219. Spiller R, Major G. IBS and IBD - separate entities or on a spectrum? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(10):613-621.
220. Mercado C P , Kilic F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* 2010;10: 231– 241.
221. Waclawiková B, El Aidy S. Role of Microbiota and Tryptophan Metabolites in the Remote Effect of Intestinal Inflammation on Brain and Depression. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(3):63.

222. Margolis KG, Pothoulakis C. Serotonin has a critical role in the pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1562–1566.
223. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front Cardiovasc Med*. 2017; 4: 48.
224. Ahern GP. 5-HT and the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(1):29–33.
225. Coates MD, Tekin I, Vrana KE, Mawe GM. Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(6):569–580.
226. Shajib MS, Baranov A, Khan WI. Diverse Effects of Gut-Derived Serotonin in Intestinal Inflammation. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(5):920–931.
227. Oshima S, Fujimura M, Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol*. 1999;112:257-263.
228. Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285: G207-G216.
229. O’Hara JR, Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA. Ileitis alters neuronal and enteroendocrine signalling in guinea pig distal colon. *Gut*. 2007;56:186-194.
230. Magro F, Fraga S, Azevedo I, Soares-da-Silva P. Intestinal 5-hydroxytryptamine and mast cell infiltration in rat experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2006;51:495-501.
231. O’Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G998-G1007.
232. El-Salhy M, Hatlebakk JG. Changes in enteroendocrine and immune cells following colitis induction by TNBS in rats. *Mol Med Rep*. 2016;14:4967-4974.

233. Bailey C, Ruaux C, Stang BV, Valentine BA. Expression of serotonin, chromogranin-A, serotonin receptor-2B, tryptophan hydroxylase-1, and serotonin reuptake transporter in the intestine of dogs with chronic enteropathy. *J Vet Diagn Invest.* 2016;28:271-278.
234. Qian BF, El-Salhy M, Melgar S, Hammarstrom ML, Danielsson A. Neuroendocrine changes in colon of mice with a disrupted IL-2 gene. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:424-433.
235. Shajib MS, Wang H, Kim JJ, Sunjic I, Ghia JE, Denou E, et al. Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS One.* 2013 Aug 28;8(8):e72774.
236. Linden DR, Foley KF, McQuoid C, Simpson J, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17: 565-574.
237. Bertrand PP, Barajas-Espinosa A, Neshat S, Bertrand RL, Lomax AE. Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298:G446-G455.
238. Haub S, Ritze Y, Bergheim I, Pabst O, Gershon MD, Bischoff SC. Enhancement of intestinal inflammation in mice lacking interleukin 10 by deletion of the serotonin reuptake transporter. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22:826-834.e229.
239. Matsumoto K, Lo MW, Hosoya T, Tashima K, Takayama H, Murayama T, et al. Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Lab Invest.* 2012;92(5):769-782.
240. Guseva D, Holst K, Kaune B, Meier M, Keubler L, Glage S, et al. Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor is critically involved in acute and chronic inflammation of the gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(9):1516-1529.

241. Tada Y, Ishihara S, Kawashima K, Fukuba N, Sonoyama H, Kusunoki R, et al. Downregulation of serotonin reuptake transporter gene expression in healing colonic mucosa in presence of remaining low-grade inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(8):1443-1452.
242. Kim JJ, Bridle BW, Ghia JE, Wang H, Syed SN, Manocha MM, et al. Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT<sub>7</sub>) receptor function modulates immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4795-4804.
243. Linden DR, Sharkey KA, Ho W, Mawe GM. Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurons in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol*. 2004;557(Pt 1):191–205.
244. Wheatcroft J, Wakelin D, Smith A, Mahoney CR, Mawe G, Spiller R. Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterol Motil*. 2005;17:863-870.
245. Rapalli A, Bertoni S, Arcaro V, Saccani F, Grandi A, Vivo V, et al. Dual role of endogenous serotonin in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Front Pharmacol*. 2016;7:68.
246. MacEachern SJ, Keenan CM, Papakonstantinou E, Sharkey KA, Patel BA. Alterations in melatonin and 5-HT signalling in the colonic mucosa of mice with dextran-sodium sulfate-induced colitis. *Br J Pharmacol*. 2018;175(9):1535–1547.
247. Matsumoto K. Immunohistochemical analysis of altered serotonin signaling and transient receptor potential vanilloid 1 channels in experimental colitis mice *Yakugaku Zasshi*. 2014;134(11):1165–1170.
248. Bertrand PP, Hu X, Mach J, Bertrand RL. Serotonin (5-HT) release and uptake measured by real-time electrochemical techniques in the rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(6):G1228–G1236.

249. Yang GB, Lackner AA. Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) is suggestive of a role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity. *J Neuroimmunol.* 2004;146(1-2):46–49.
250. Regmi SC, Park SY, Ku SK, Kim JA. Serotonin regulates innate immune responses of colon epithelial cells through Nox2-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2014;69:377-389.
251. Ghia JE, Li N, Wang H, Collins M, Deng Y, El-Sharkawy RT, Côté F, et al. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1649-1660.
252. Kim JJ, Wang H, Terc JD, Zambrowicz B, Yang QM, Khan WI. Blocking peripheral serotonin synthesis by telotristat etiprate (LX1032/LX1606) reduces severity of both chemical- and infection- induced intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309:G455-G465.
253. Margolis KG, Stevanovic K, Li Z, Yang QM, Oravec T, Zambrowicz B, et al. Pharmacological reduction of mucosal but not neuronal serotonin opposes inflammation in mouse intestine. *Gut.* 2014;63(6):928-937.
254. Pascual D, Alsasua A, Goicoechea C, Martin MI. The involvement of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in two models of gastrointestinal transit in mice. *Neurosci Lett.* 2002;326:163-166.
255. Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, et al. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G685-G695.
256. Nau F Jr, Yu B, Martin D, Nichols CD. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation blocks TNF- $\alpha$  mediated inflammation in vivo. *PLoS ONE.* 2013;8:e75426.

257. Fakhfouri G, Rahimian R, Daneshmand A, Bahremand A, Rasouli MR, Dehpour AR, et al. Granisetron ameliorates acetic acid-induced colitis in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010;29: 321-328.
258. Mousavizadeh K, Rahimian R, Fakhfouri G, Aslani FS, Ghafourifar P. Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:375-383.
259. Belkind-Gerson J, Hotta R, Nagy N, Thomas AR, Graham H, Cheng L, et al. Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT<sub>4</sub>-dependent mechanism. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:870-878.
260. Spohn SN, Bianco F, Scott RB, Keenan CM, Linton AA, O'Neill CH, et al. Protective actions of epithelial 5-hydroxytryptamine 4 receptors in normal and inflamed colon. *Gastroenterology*. 2016;151:933-944.e933.
261. Kwon YH, Wang H, Denou E, Ghia JE, Rossi L, Fontes ME, et al. Modulation of gut microbiota composition by serotonin signaling influences intestinal immune response and susceptibility to colitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7(4):709-728.
262. Stavely R, Fraser S, Sharma S, Rahman AA, Stojanovska V, Sakkal S, et al. The onset and progression of chronic colitis parallels increased mucosal serotonin release via enterochromaffin cell hyperplasia and downregulation of the serotonin reuptake transporter. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(5):1021-1034.
263. Manzella C, Singhal M, Alrefai WA, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK. Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci Rep*. 2018;8(1):6103.
264. Koh SJ, Kim JW, Kim BG, Lee KL, Im JP, Kim JS. Fluoxetine inhibits hyperresponsive lamina propria mononuclear cells and bone marrow-derived dendritic cells, and ameliorates chronic colitis in IL-10- deficient mice. *Dig Dis Sci*. 2015;60:101-108.



265. Minaiyan M, Hajhashemi V, Rabbani M, Fattahian E, Mahzouni P. Evaluation of anti-colitic effect of fluvoxamine against acetic acid- induced colitis in normal and reserpinized depressed rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;746:293-300.
266. Koh SJ, Kim JM, Kim IK, Kim N, Jung HC, Song IS, et al. Fluoxetine inhibits NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301:G9-G19.
267. Galligan JJ. 5-hydroxytryptamine, ulcerative colitis, and irritable bowel syndrome: molecular connections. *Gastroenterology.* 2004;126(7):1897–1899.
268. Verity MA, Mellinkoff SM, Frankland M, Greipel M. Serotonin content and argentaffin and Paneth cell changes in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1962;43:24-31.
269. Capurso L, Friedmann CA. Distribution of 5-OH tryptamine (serotonin) in ulcerative colitis. *Proc R Soc Med.* 1970;63(Suppl.):20-21.
270. El-Salhy M, Danielsson A, Stenling R, Grimelius L. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 1997;242:413-419.
271. Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem.* 2002;104:185-192.
272. Magro F, Vieira-Coelho MA, Fraga S, Serrão MP, Veloso FT, Ribeiro T, et al. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2002;47(1):216-24.
273. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004;126(7):1657-64.

274. Foley KF, Pantano C, Ciolino A, Mawe GM. IFN-gamma and TNF-alpha decrease serotonin transporter function and expression in Caco2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G779-G784.
275. Minderhoud IM, Oldenburg B, Schipper ME, ter Linde JJ, Samsom M. Serotonin synthesis and uptake in symptomatic patients with Crohn's disease in remission. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5: 714-720.
276. Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, Modlin IM. IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21:439-450.
277. Wang Y, Gong H, Lopez R, Lian L, Kiran RP, Soffer EE, et al. Correlation between serum serotonin and endoscopy inflammation scores in patients with ileal pouches. *J Crohns Colitis.* 2013;7(4):e133-142
278. Latorre E, Mendoza C, Matheus N, Castro M, Grasa L, Mesonero JE, et al. IL-10 modulates serotonin transporter activity and molecular expression in intestinal epithelial cells. *Cytokine.* 2013;61:778-784.
279. Sikander A, Sinha SK, Prasad KK, Rana SV. Association of serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) with microscopic colitis and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 2015;60:887-894.
280. Goldner D, Margolis KG. Association of Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (5HTTLPR) with Microscopic Colitis and Ulcerative Colitis: Time to Be AsSERTive?. *Dig Dis Sci.* 2015;60(4):819–821.
281. Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(12):3451-3459.
282. Shajib MS, Chauhan U, Adeeb S, Chetty Y, Armstrong D, Halder SLS, et al. Characterization of serotonin signaling components in patients with inflammatory bowel disease. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2019 Aug;2(3):132-140.

283. Giuffrida P, Vanoli A, Biletta E, Klersy C, Bergamaschi G, Sampietro GM, et al. Increase in chromogranin A- and serotonin-positive cells in pouch mucosa of patients with ulcerative colitis undergoing proctocolectomy. *Dig Liver Dis.* 2018;50(11):1205-1213.
284. Lu SJ, Liu YQ, Lin JS, Wu HJ, Sun YH, Tan YB. VIP immunoreactive nerves and somatostatin and serotonin containing cells in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 1999;5(6):541–543.
285. Wojtal KA, Eloranta JJ, Hruz P, Gutmann H, Drewe J, Staumann A, et al. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(9):1871-1877.
286. Liñán-Rico A, Wunderlich JE, Grants IS, Frankel WL, Xue J, Williams KC, et al. Purinergic autocrine regulation of mechanosensitivity and serotonin release in a human EC model: ATP-gated P2X3 channels in EC are downregulated in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(11):2366-2379.
287. Chojnacki C, Wiśniewska-Jarosińska M, Kulig G, Majsterek I, Reiter RJ, Chojnacki J. Evaluation of enterochromaffin cells and melatonin secretion exponents in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3602–3607.
288. Szpakowicz T, Boroń P, Borzuchowska A, Kaczmarska A, Kuroczycka I, Prokopowicz D, et al. Badania nad serotoninem u chorych z wrzodziejacym zapaleniem jelita grubego (WZJG) [Blood serotonin levels in patients with ulcerative colitis]. *Przegl Lek.* 1986;43(3):313-315.
289. Morita H. Histamine/serotonin ratio (H/S ratio): a new scale for determining the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol.* 1992;15(2):159–160.
290. Sherman Horev H, Rabinowitz KM, Elad H, Barkan R, Ben-Shachar S, Pasmanik CM, et al. Increase in processing factors is involved in skewed microRNA expression in patients with ulcerative colitis who develop small intestine inflammation after pouch surgery. *Inflamm Bowel Dis.* 2018;24(5):1045-1054.

291. Meianu C, Preda C, Becheanu G, Ciora C, Proca D, Dumbrava M, et al. Alteration of serotonin positive cells in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Research and Science Today*. 2019;1: 230-238.
292. Guloksuz S, Wichers M, Kenis G, Russel MG, Wauters A, Verkerk R, et al. Depressive symptoms in Crohn's disease: relationship with immune activation and tryptophan availability. *PLoS One*. 2013;8(3):e60435.
293. Wojtal KA, Cee A, Lang S, Götze O, Frühauf H, Geier A, et al. Downregulation of duodenal SLC transporters and activation of proinflammatory signaling constitute the early response to high altitude in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307(7):G673-88.
294. Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismair MG, Hiller C, Fried M, et al. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(4):590-4.
295. Capurso L, Friedmann CA, Onori L, Paoluzi P, Cassano CC. Fluorescence of the 5-HT content of the human colonic mucosa. *Arch Ital Mal Appar Dig*. 1969;35(6):613-618.
296. Murphy DL, Fox MA, Timpano KR, Moya PR, Ren-Patterson R, Andrews AM, et al. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology*. 2008;55(6):932-960.
297. Murphy DL, Moya PR. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(1):3-10.
298. Dammen R, Haugen M, Svejda B, Alaimo D, Brenna O, Pfragner R, et al. The stimulatory adenosine receptor ADORA2B regulates serotonin (5-HT) synthesis and release in oxygen-depleted EC cells in inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2013;8(4):e62607.

299. Layunta E, Latorre E, Forcén R, Grasa L, Castro M, Arias MA, et al. NOD2 Modulates Serotonin Transporter and Interacts with TLR2 and TLR4 in Intestinal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(3):1217-1229.
300. Young MR, Matthews JP. Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function. *Immunology*. 1995;84(1):148-152.
301. Worrall DM, Williams DC. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochem J* 1994, 297( Pt 3):425 – 436.
302. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(6):2542-2546.
303. Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Role of the 5-HTTLPR and SNP promoter polymorphisms on serotonin transporter gene expression: a closer look at genetic architecture and in vitro functional studies of common and uncommon allelic variants. *Mol Neurobiol*. 2016;53(8):5510–5526.
304. Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet*. 1997; 101(2):243-246.
305. Odgerel Z, Talati A, Hamilton SP, Levinson DF, Weissman MM. Genotyping serotonin transporter polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531 in European- and African-American subjects from the National Institute of Mental Health's Collaborative Center for Genomic Studies. *Transl Psychiatry*. 2013;3(9):e307.
306. Murdoch JD, Speed WC, Pakstis AJ, Heffelfinger CE, Kidd KK. Worldwide population variation and haplotype analysis at the serotonin transporter gene SLC6A4 and implications for association studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74(12):879–889.

307. Hranilovic D, Stefulj J, Furac I, Kubat M, Balija M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims. *Biol Psychiatry*. 2003;54(9):884–889.
308. Battersby S, Ogilvie AD, Smith CA, Blackwood DH, Muir WJ, Quinn JP, et al. Structure of a variable number tandem repeat of the serotonin transporter gene and association with affective disorder. *Psychiatr Genet*. 1996;6(4):177-181.
309. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274(5292):1527-31.
310. Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*. 1996;66(6):2621-2624.
311. Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry*. 2000;5(1):32–38.
312. Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of human platelet serotonin (5HT) uptake site-identity with the brain 5-HT transporter. *J Neurochem*. 1993; 60:2319-2322.
313. Luca VD, Tharmalingam S, King N, Strauss J, Bulgin N, Kennedy JL. Association study of a novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene in bipolar disorder and suicidal behaviour. *Psychopharmacology*. 2005; 182:128-131.
314. Goldman D, Hu X, Zhu G, Lipsky R, Murphy D. The serotonin transporter: New alleles, function and phenotype. In: 3<sup>rd</sup> Annual Pharmacogenetics in Psychiatry Meeting 1994. p. 16-17.
315. Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol. Psychiatry*. 2006; 11:224–226.

316. Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29: 8–16.
317. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv.* 2004;4(2):109–123.
318. Murphy DL, Lesch KP. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(2):85–96.
319. Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* 2006;78(5):815-826.
320. Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science.* 1991;254(5031):579–580.
321. Chen JX, Pan H, Rothman TP, Wade PR, Gershon MD. Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution, and function in intestinal sensory reception. *Am J Physiol.* 1998;275(3):G433–G448.
322. Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD. Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;43(1-2):185–192.
323. Mortensen OV, Kristensen AS, Rudnick G, Wiborg O. Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;71(1):120–126.
324. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2542-2546.
325. Takayanagi S, Hanai H, Kumagai J, Kaneko E. Serotonin uptake and its modulation in rat jejunal enterocyte preparation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(3):1151–1159.

326. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci*. 1996;16(7):2352–2364.
327. Martel F, Monteiro R, Lemos C. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(1):355–362.
328. Gill RK, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir TM, Vohwinkel L, et al. Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Jan;294(1):G254-262.
329. van Lelyveld N, Ter Linde J, Schipper ME, Samsom M. Regional differences in expression of TPH-1, SERT, 5-HT(3) and 5-HT(4) receptors in the human stomach and duodenum. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19(5):342–348.
330. Layunta E, Latorre E, Forcén R, Grasa L, Plaza MA, Arias M, et al. NOD1 downregulates intestinal serotonin transporter and interacts with other pattern recognition receptors. *J Cell Physiol*. 2018;233(5):4183-4193.
331. Barbaro MR, Di Sabatino A, Cremon C, Giuffrida P, Fiorentino M, Altimari A, et al. Interferon- $\gamma$  is increased in the gut of patients with irritable bowel syndrome and modulates serotonin metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Mar 15;310(6):G439-447.
332. Nazir S, Kumar A, Chatterjee I, Anbazhagan AN, Gujral T, Priyamvada S, et al. Mechanisms of Intestinal Serotonin Transporter (SERT) Upregulation by TGF- $\beta$ 1 Induced Non-Smad Pathways. *PLoS One*. 2015;10(5):e0120447.
333. Gill RK, Anbazhagan AN, Esmaili A, Kumar A, Nazir S, Malakooti J, et al. Epidermal growth factor upregulates serotonin transporter in human intestinal epithelial cells via transcriptional mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Apr;300(4):G627-636.



334. Park JM, Choi MG, Park JA, Oh JH, Cho YK, Lee IS, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2006 Nov;18(11):995-1000.
335. Colucci R, Blandizzi C, Bellini M, Ghisu N, Tonini M, Del Tacca M. The genetics of the serotonin transporter and irritable bowel syndrome. *Trends Mol Med.* 2008;14(7):295–304.
336. Zhang ZF, Duan ZJ, Wang LX, Yang D, Zhao G, Zhang L. The serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and irritable bowel syndrome: a meta-analysis of 25 studies. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:23.
337. Areeshi MY, Haque S, Panda AK, Mandal RK. A serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphism is associated with reduced risk of irritable bowel syndrome in American and Asian population: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(9):e75567.
338. Niesler B, Kapeller J, Fell C, Atkinson W, Möller D, Fischer C, et al. 5-HTTLPR and STin2 polymorphisms in the serotonin transporter gene and irritable bowel syndrome: effect of bowel habit and sex. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(7):856-861.
339. Mohammadi M, Tahmasebi Abdar H, Mollaei HR, Hajghani H, Baneshi MR, et al. Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Polymorphism and Mucosal Serotonin Levels in Southeastern Iranian Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Middle East J Dig Dis.* 2017;9(1):26–32.
340. Kumar S, Ranjan P, Mittal B, Ghoshal UC. Serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphism in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2012;21(1):31–38.
341. Wang T, Zhang QY, Liang DC, Sun B, Wang BM. Serotonin transporter gene promoter region polymorphisms and serotonin transporter expression in the colonic mucosa of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24(6):560-5, e254-5.

342. Jin DC, Cao HL, Xu MQ, Wang SN, Wang YM, Yan F, et al. Regulation of the serotonin transporter in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2016 Sep 28;22(36):8137-8148.
343. Jia Z, Wang L, Yu B, Li Q, Dong X. Association between polymorphisms in the serotonin transporter gene-linked polymorphic region and risk for irritable bowel syndrome in China: evidence based on a meta-analysis. *J Int Med Res*. 2019;47(7):2810–2818.
344. Zhu Y, Zheng G, Hu Z. Association between SERT insertion/deletion polymorphism and the risk of irritable bowel syndrome: A meta-analysis based on 7039 subjects. *Gene*. 2018;679:133–137.
345. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
346. Suguna S, NAndal DH, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int. j. pharm. pharm. sci.*2014;6:198-199.
347. Grubelic Ravić K, Paić F, Vucelić B, Brinar M, Čuković-Čavka S, Božina N, Krznarić Ž, et al. Association of polymorphic variants in serotonin re-uptake transporter gene with Crohn's disease: a retrospective case-control study. *Croat Med J*. 2018;59(5):232-243.
348. Markeljevic J, Sarac H, Bozina N, Henigsberg N, Simic M, Cicin Sain L. Serotonin transporter gene polymorphisms: Relation with platelet serotonin level in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Neuroimmunol*. 2015; 282:104-109.
349. Rausch JL, Johnson ME, Fei YJ, Li JQ, Shendarkar N, Hobby HM, et al. Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: influence on SSRI treatment trial outcome. *Biol Psychiatry*. 2002; 51(9):723-732.

350. Bozina N, Medved V, Kuzman MR, Sain I, Sertic J. Association study of olanzapine-induced weight gain and therapeutic response with SERT gene polymorphisms in female schizophrenic patients. *J Psychopharmacol*. 2007; 7:728-734.
351. Ito K, Yoshida K, Sato K, Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, et al. A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine. *Psychiatry Res*. 2002; 2-3:235-239.
352. Solé X1, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
353. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 2005; 15(2):97-98.
354. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007; 39:175-191.
355. Bozina N, Mihaljević-Peles A, Sagud M, Jakovljević M, Sertić J. Serotonin transporter polymorphism in Croatian patients with major depressive disorder. *Psy-chiatr Danub*. 2006; 1-2:83-89.
356. Noskova T, Pivac N, Nedic G, Kazantseva A, Gaysina D, Faskhutdinova G, et al. Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 7:1735-1739.
357. Culej J, Štefanović M, Čelap I, Nikolac N, Karlović D. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in Croatian population. *Mol Biol Rep*. 2015 Feb; 42(2):553-8.
358. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 4:205-217.

359. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007; 3:514-521.
360. Burisch J. Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population-based inception cohort. *Dan Med J.* 2014; 1: B4778.
361. Xia B, Crusius J, Meuwissen S, Pena A. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J Gastroen-terol.* 1998; 5: 446-458.
362. Shiotani A, Kusunoki H, Kimura Y, Ishii M, Imamura H, Tarumi K, et al. S100A expression and interleukin-10 polymorphisms are associated with ulcerative co-litis and diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 2013; 8:2314-2323.
363. Prasad HC, Zhu CB, McCauley JL, Samuvel DJ, Ramamoorthy S, Shelton RC, et al. Human serotonin transporter variants display altered sensitivity to protein kinase G and p38 mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:11545–11550.
364. Wendland JR, DeGuzman TB, McMahon F, Rudnick G, Detera-Wadleigh SD, Murphy DL. SERT Ileu425Val in autism, Asperger syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet.* 2008; 18:31–39.
365. Wendland JR, Kruse MR, Cromer KC, Murphy DL. A Large Case-Control Study of Common Functional SLC6A4 and BDNF Variants in Obsessive-Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32:2543–2551.
366. Kilic, F., Murphy, D.L., Rudnick, G., 2003. A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. *Mol. Pharmacol.* 64,440–446.
367. Lovejoy EA., Scott AC, Fiskerstrand C.E., Bubb VJ, Quinn JP, The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to

- affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur. J. Neurosci.* 2003.;17:417–420.
368. Sutcliffe JS, Delahanty R.J., Prasad H C, McCauley JL, Han Q, Jiang L, et al. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;77: 265–279.
369. Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, et al. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2005; 10(8):771-781.
370. Bonvicini C, Minelli A, Scassellati C, Bortolomasi M, Segala M, Sartori R, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms and treatment-resistant depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34(6):934-9.
371. Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 1999; 458(2):171-174.
372. Gelernter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene. *Am J Med Genet.* 1999;88:61–66.
373. MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:15251–15255.
374. Hranilovic D, Stefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, et al. Serotonin transporter promotor and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry* 2004; 55:1090–1094.

375. Ebstein RP. The molecular genetic architecture of human personality: beyond self-report questionnaires. *Mol Psychiatry* 2006; 11:427–445.
376. Kohen R, Jarrett ME, Cain KC, Jun SE, Navaja GP, Symonds S, Heitkemper MM. The serotonin transporter polymorphism rs25531 is associated with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(12):2663-70.
377. Farjadian S, Fakhraei B, Moeini M, Nasiri M, Fattahi MR. Serotonin transporter gene polymorphisms in Southwestern Iranian patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol*. 2013; 14(2):59-62.
378. Li YY, Nie YQ, Xie J, Tan HZ, Zhou YJ, Wang H. Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome and their impact on tegaserod treatment. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2006; 45(7):552-5.
379. Yuan J, Kang C, Wang M, Wang Q, Li P, Liu H, et al . Association study of serotonin transporter SLC6A4 gene with Chinese Han irritable bowel syndrome. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84414.
380. Jarrett ME, Kohen R, Cain KC, Burr RL, Poppe A, Navaja GP, et al. Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome. *Biol Res Nurs*. 2007; 9(2):161-169.
381. Wang BM, Wang YM, Zhang WM, Zhang QY, Liu WT, Jiang K, et al. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2004; 43(6):439-41.
382. Chen YB, Zhang BL, Zhang XY, Liu FT, Wu AC. Relationship of IBS and SERT polymorphism after intestinal infection. *Modern Hospital*. 2010; 10; 11-13.
383. Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbins M, et al. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome in women. *Gut*. 2004; 53(10):1452–1458.

384. Park JM, Choi MG, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Choi KY, et al. Cannabinoid receptor 1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome in the Korean population: a hypothesis-generating study. *J Clin Gastroenterol* 45: 45–49, 2011.
385. Li Y, Nie Y, Xie J, Li Y, Nie Y, Xie J, et al The association of serotonin transporter genetic polymorphisms and irritable bowel syndrome and its influence on tegaserod treatment in Chinese patients. *Dig Dis Sci.* 2007; 52(11):2942–2949.
386. Moses PL, Coates MD, Mahoney CR, Mahoney RC, Sampson JE et al.. Key elements of serotonin signaling are altered in IBD and IBS: support for a molecular basis of the irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98 (suppl 1):S262–263.
387. Wendelbo I, Mazzawi T, El-Salhy M. Increased serotonin transporter immunoreactivity intensity in the ileum of patients with irritable bowel disease. *Mol Med Rep.* 2014; 9(1):180-184.
388. El-Salhy M, Wendelbo I, Gundersen D. Serotonin and serotonin transporter in the rectum of patients with irritable bowel disease. *Mol Med Rep.* 2013; 8(2):451-5.
389. Kerckhoffs AP, ter Linde JJ, Akkermans LM, Samsom M. SERT and TPH-1 mRNA expression are reduced in irritable bowel syndrome patients regardless of visceral sensitivity state in large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302(9):G1053-1060.
390. Kerckhoffs AP, Ter Linde JJ, Akkermans LM, Samsom M. Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil.* 2008; 20(8):900-7.
391. Foley S, Garsed K, Singh G, Duroudier NP, Swan C, Hall IP, et al. Impaired uptake of serotonin by platelets from patients with irritable bowel syndrome correlates with duodenal immune activation. *Gastroenterology.* 2011; 140(5):1434-43.e1.

392. Camilleri M, Andrews CN, Bharucha AE, Carlson PJ, Ferber I, Stephens D, et al. Alterations in expression of p11 and SERT in mucosal biopsy specimens of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2007; 132(1):17-25.
393. Geeraerts B, van Oudenhove L, Tack J. Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2006; 18(11):957-959.
394. Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Clin North Am*. 2005; 34(2):235-45, vi-vii.
395. Isgar B, Harman M, Kaye MD, Whorwell PJ. Symptoms of irritable bowel syndrome in ulcerative colitis in remission. *Gut* 1983; 24:190-192.
396. Minderhoud IM, Oldenburg B, Wismeijer JA, Berge Henegouwen GP, Smout AJ. IBS like symptoms in patients with inflammatory bowel disease in remission; relationships with quality of life and coping behavior. *Dig Dis Sci* 2004; 49:469-474.
397. Simren M, Axelsson J, Gillberg R, Abrahamsson H, Svedlund J, Bjornsson ES. Quality of life in inflammatory bowel disease in remission: the impact of IBS-like symptoms and associated psychological factors. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:389.-396.
398. Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Wallamander MA, Johansson S, Olbe L. Detection of colorectal tumors and inflammatory bowel disease during follow up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:306-311.
399. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008; 135(3):781-786.



400. Porter CK, Cash BD, Pimentel M, Akinseye A, Riddle MS. Risk of inflammatory bowel disease following a diagnosis of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 2012; 12:55.
401. Wendland JR, Moya PR, Kruse MR, Ren-Patterson RF, Jensen CL, Timpano KR, et al. A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associates with obsessive-compulsive disorder. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 1; 17(5):717-723.;
402. Delbrück SJ, Wendel B, Grunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq MA, et al. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 79(3-4):214-220.
403. Sonuga-Barke EJ, Kumsta R, Schlotz W, Lasky-Su J, Marco R, Miranda A, et al. A functional variant of the serotonin transporter gene (SLC6A4) moderates impulsive choice in attention-deficit/hyperactivity disorder boys and siblings. *Biol Psychiatry.* 2011;70:230–236.
404. Steffens DC, Taylor WD, McQuoid DR, Krishnan KR. Short/long heterozygotes at 5HTTLPR and white matter lesions in geriatric depression. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2008;23:244–248.
405. Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct; 71(1-2):19-31.
406. Faure C, Patey N, Gauthier C, Brooks EM, Mawe GM. Serotonin signaling is altered in irritable bowel syndrome with diarrhea but not in functional dyspepsia in pediatric age patients. *Gastroenterology.* 2010; 139: 249-258.
407. Van Kerkhoven LA, Laheij RJ, Jansen JB. Meta-analysis: a functional polymorphism in the gene encoding for activity of the serotonin transporter protein is not associated with the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(7):979–986.
408. Jia Z, Wang L, Yu B, Li Q, Dong X. Association between polymorphisms in the serotonin transporter gene-linked polymorphic region and risk for irritable

bowel syndrome in China: evidence based on a meta-analysis. *J Int Med Res.* 2019;47(7):2810–2818.

## **11. KRATKA BIOGRAFIJA**

Katja Grubelić Ravić rođena je u Puli 1974. godine , gdje je pohađala osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisala je 1993 godine, a diplomirala je 2000. godine.

Pripravnički staž obavljala je od 2001 do 2002 godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb te je položila državni ispit. Tijekom 2003 godine zaposlena je u inovativnoj farmaceutskoj kompaniji Eli Lilly u Odjelu medicinskih istraživanja iz područja interne medicine .

Specijalizaciju iz interne medicine započela je veljači 2004 godine u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod mentorstvom prof.dr.sc. Borisa Vucelića. Specijalistički ispit položila je u rujnu 2009. godine. Godine 2010 započela je subspecijalizaciju iz gastroenterologije i hepatologije pod mentorstvom prof.dr.sc. Borisa Vucelića. Subspecijalistički ispit polaže u srpnju 2014. godine. Član je Hrvatskog gastroenterološkog društva i Europskog društva gastrointestinalne endoskopije. Aktivno je sudjelovala na više znanstvenih i stručnih skupova u Hrvatskoj i inozemstvu, autor je i koautor 11 stručno – znanstvenih članaka, od kojih se 5 citira u Current Contents, te 40 sažetaka iz gastroenterologije i hepatologije.

Udana je i majka je dvoje djece.