

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nikša Turk

**Metabolička bolest kostiju u Crohnovoj
bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2008

1.	U V O D	
1.	Crohnova bolest	
1.1	Epidemiologija	1
1.2.	Etiologija bolesti	2
1.2.1.	Patogeneza bolesti	3
1.2.2.	Genetika	4
1.3.	Klinička slika	7
1.3.1.	Crohnova bolest jednjaka, želuca i dvanaesnika	8
1.3.2.	Bolest tankog crijeva	8
1.3.3.	Bolest debelog crijeva	9
1.3.4.	Perianalna bolest	9
1.3.5.	Klinički tijek i ponašanje bolesti	10
1.3.6.	Procjena aktivnosti bolesti	11
1.4.	Izvancrijevne manifestacije bolesti	12
1.4.1.	Patogeneza izvancrijevnih manifestacija	12
1.4.2.	Manjak koštane mase i osteoporoza	15
1.4.3.	Metabolizam koštanog tkiva u upalnim bolestima crijeva	15
1.4.4.	Terapija metaboličke bolesti kostiju	18
1.5.	Dijagnoza bolesti	18
1.5.1	Laboratorijski nalazi	18
1.5.2.	Dijagnostičke pretrage	20
1.5.3.	Diferencijalna dijagnoza Crohnove bolesti	22
1.6.	Osnove liječenja Crohnove bolesti	23
1.6.1.	Medikamentno liječenje	23
1.6.2.	Nutritivna potpora liječenju	24
1.6.3.	Kirurško liječenje	25
2.	HIPOTEZA I CILJEVI	26

3.	BOLESNICI, PROTOKOL ISTRAŽIVANJA, METODE I OBRADA PODATAKA	
3.1.	Bolesnici i protokol istraživanja	28
3.2.	Metode za mjerenje koštanog statusa	29
3.2.1.	Metoda dvostruke apsorpciometrije X-zraka (DXA)	29
3.2.2.	Metoda kvantitativnog ultrazvuka (QUS)	30
3.3.	Parametri signalnog puta RANK / RANK-ligand / osteoprotegerin	30
3.3.1.	RANKL	31
3.3.2.	Osteoprotegerin	31
3.4.	Proupalni citokini: TNF-α, IL-1 β i IL-6	31
3.5.	Biljezi koštane pregradnje	32
3.5.1.	Osteokalcin	32
3.5.2.	C-telopeptid	32
3.6.	Statistička obrada podataka	33
4.	R E Z U L T A T I	
4.1.	Bolesnici s Crohnovom bolesti	35
4.1.1.	Osnovne kliničke karakteristike	35
4.1.2.	Koštani status mjeren DXA metodom	36
4.2.	Evaluacija biokemijskih parametara	36
4.2.1.	Osteoklastični čimbenici	36
4.2.2.	Proupalni citokini	38
4.2.3.	Biljezi koštane pregradnje	40
4.3.	Korelacija koštanog statusa i biokemijskih parametara	40
4.4.	Koštani status u naivnih bolesnika s Crohnovom bolesti	45
4.5.	Terapija kortikosteroidima i koštani status	48
4.6.	Frakture	48
4.7.	Vrednovanje metoda DXA i QUS pri određivanju koštanog statusa	49
4.7.1.	Mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS)	49
4.7.2.	Usporedba rezultata mjerenja koštanog statusa metodama DXA i QUS	52

Sadržaj

5.	R A S P R A V A	
5.1.	Evaluacija koštanog statusa u bolesnika s Crohnovom bolesti	55
5.2.	Utjecaj osteoklastičnih i proupalnih parametra na mineralnu gustoću kostiju	56
5.3.	Biljezi koštane pregradnje	60
5.4.	Vrednovanje mjerenja ultrazvuka petne kosti pri određivanju koštanog statusa	61
6.	ZAKLJUČCI	65
7.	BIBLIOGRAFIJA	67
8.	POPIS KRATICA	75
9.	SAŽETAK	76
10.	ABSTRACT	78
11.	ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA	80

Crohnova bolest je kronični, idiopatski, upalni poremećaj koji može segmentalno zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava s predilekcijom za terminalni ileum. Crohnova je bolest zajedno s ulceroznim kolitisom kronična, upalna bolest crijeva, u osnovi kojih je imunološki poremećaj. Ponekad manji dio bolesnika (oko 10%) u samom početku bolesti nije moguće klinički i dijagnostički uvrstiti niti u jednu od navedenih fenotipskih grupa, pa tada govorimo o nedeterminiranom kolitisu.

1.1. EPIDEMIOLOGIJA

Rezultati niza epidemioloških istraživanja pokazali su visoku incidenciju Crohnove bolesti u industrijaliziranim zemljama Europe (3-11/100 000) i sjeverne Amerike (7/100 000). U našoj se zemlji, u razdoblju 80-ih i početkom 90-ih godina pojavnost Crohnove bolesti kretala između 0,7-2,4 na 100 000 stanovnika godišnje (1,2). Nakon što je posljednjih desetljeća zabilježen značajni porast učestalosti i prevalencije upalnih bolesti crijeva u visoko industrijaliziranim zemljama, novija istraživanja govore u prilog stabilizacije broja oboljelih u tim regijama. Naprotiv, u zemljama u razvoju, pa tako i u Hrvatskoj, zamjećena je tendencija porasta novo oboljelih. Upalne bolesti crijeva pokazuju bimodalnu dobnu distribuciju s najvećom incidencijom u adolescenata i mlađih odraslih osoba, te drugi manji vršak između petog i osmog desetljeća života (1,2). Pojedine studije govore u prilog učestalije Crohnove bolesti u žena te ulceroznog kolitisa u muškaraca, međutim čini se da upalne bolesti crijeva ipak podjednako zahvaćaju oba spola (2).

Proučavanjem rasne pripadnosti oboljelih uočena je veća učestalost upalnih bolesti crijeva u Aškenazi židova i crnaca u usporedbi s ostatkom bijele rase. Incidencija Crohnove bolesti u Aškenazi židova je tako 3-8 puta veća od učestalosti u drugim populacijama (2). Smatra se kako neki od kulturalnih čimbenika, primjerice prehrambene i zdravstvene navike određenih etničkih i rasnih entiteta mogu odlučujuće utjecati na incidenciju upalnih bolesti crijeva.

Od čimbenika rizika za upalne bolesti crijeva pušenje je, u najvećem broju studija, vrednovano s konzistentnim rezultatima. Relativni rizik pušača da obole od Crohnove bolesti veći je od 1,2 do 3,9 puta uz povećanu sklonost relapsima

bolesti i težem kliničkom tijeku (2). Negativni učinak pušenja pripisuje se ugljikovom monoksidu u dimu cigareta koji može potencirati upalnu aktivnost u crijevu. Od ostalih rizičnih faktora spominju se oralni kontraceptivi, prehrana bogata rafiniranim šećerom, upotreba NSAR, te neke infekcije. Kao potencijalni crijevni patogeni godinama su spominjani *Diplostreptococcus*, *Entamoeba histolytica* i posebice *Mycobacterium paratuberculosis* te *virus ospica*. Ipak, čvrsti dokazi koji bi podupirali teoriju patogenog čimbenika u razvoju upalnih bolesti crijeva još uvijek nedostaju. Studije koje su istraživale ranije navedene čimbenike rizika su kontradiktorne, pa se njihova povezanost s Crohnovom bolešću ne može sa sigurnošću utvrditi. Incidencija i prevalencija ove bolesti jasno su povezane s urbanim sredinama i načinom života. Zanimljiv je zemljopisni gradijent sjever-jug unutar Europe koji pokazuje porast incidencije Crohnove bolesti od 80% u zemljama na sjeveru Europe prema jugu kontinenta (2). Navedena pojava nije razjašnjena, a povezuje se s razlikom u izloženošću sunčevom svjetlu, kontaktu s nekim infektivnim agensima i stupnju tjelesne aktivnosti.

1.2. ETIOLOGIJA BOLESTI

Iako etiologija Crohnove bolesti nije u potpunosti objašnjena, dosadašnjim je spoznajama potvrđeno kako je uvjetovana višestrukim čimbenicima. Smatra se kako uz faktore okoliša postoji genska predispozicija za razvoj upalnih bolesti crijeva uslijed koje dolazi do abnormalnog imunog odgovora na intraluminalni antigen (1,3). Niz studija pokazuju obiteljsku agregaciju bolesti s pozitivnom obiteljskom anamnezom upalnih bolesti crijeva u 5-10% bolesnika (4). Studije blizanaca jasno upućuju na važnost genske komponente s većom konkordancijom u monozigotnih prema dizigotnim blizancima. Između 2-22% bolesnika s Crohnovom bolesti ima rođaka u prvom nasljednom redu s anamnezom upalne bolesti crijeva (5).

1.2.1. Patogeneza bolesti

U genetski predisponiranih osoba dolazi do poremećenog imunog odgovora na luminalni antigen, a gubitak imune tolerancije rezultira nekontroliranom i prolongiranom upalom. Kako je ranije navedeno nema sigurnih dokaza za patogene mikroorganizme kao moguće uzročnike bolesti. Međutim, postoje mišljenja da specifične nepatogene bakterije mogu moderirati stupanj upalne aktivnosti, uz snažan utjecaj komensalne flore na fenotipsku ekspresiju upalne bolesti crijeva (6).

U upali izražena migracija leukocita rezultat je povećane permeabilnosti endotela i ekspresije adhezijskih molekula. Aktivirani leukociti mogu napustiti vaskularni prostor i migrirati u inflamirano tkivo posredovanjem intracelularnih adhezijskih molekula (ICAM-1, ICAM-2). Navedene su molekule proteini, članovi velike obitelji imunoglobulina, karakterizirane brojnim izvanstaničnim Ig sličnim domenama. Ekspresija $\alpha 4$ integrina dominantna je na limfocitima, monocitima, eozinofilima i bazofilima, ali ne i na neutrofilima. Interakcija na leukocitima ekspimiranih integrinskih receptora s adhezijskim molekulama (VCAM, ICAM, MAdCAM) na endotelnim stanicama omogućuje remodeliranje citoplazme za prolaz između epitelnih spona i ulazak u tkivo. Ekspresija specifičnog $\alpha 4\beta 1$ integrina povećava se u upali, kao i ekspresija njegovog liganda VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule*) koja je stimulirana povećanom citokinskom sekrecijom. Interakcija $\alpha 4\beta 1$ i VCAM-1 potiče aktivaciju, migraciju i proliferaciju limfocita, dok se blokiranjem iste u specifičnim uvjetima postiže povećanje apoptoze T stanica (3). Interakcija $\alpha 4\beta 1$ integrina i fibronektina stimulira ekspresiju matriks metaloproteinaza (MMP) koje razgrađuju i modificiraju ekstracelularni matriks (ECM) i time pomažu migraciju leukocita u upali (7). Vezanje $\alpha 4\beta 7$ integrina i MAdCAM (engl. *mucosal addressin cell adhesion molecule*) promovira nakupljanje leukocita u sluznici crijeva. U bazalnim je uvjetima endotelna ekspresija ICAM-1 niska, dok se tijekom aktivne upale ekspresija u crijevnoj mukozi višestruko povećava što je potvrđeno u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu (8). Međutim, terapijska upotreba inhibitora ICAM-1 u multicentričnim kliničkim studijama kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva nije pokazala učinkovitost. Natalizumab, humano

monoklonsko protutijelo na $\alpha 4$ integrin, istraživano je u održavanju remisije u bolesnika s Crohnovom bolesti (ENACT studije) uz zadovoljavajuće preliminarne rezultate. Od daljnje upotrebe se odustalo zbog više slučajeva progresivne multifokalne leukoencefalopatije.

Čini se da je osnova poremećenog imunološkog odgovora crijevne sluznice neregulirana aktivacija i proliferacija CD4⁺ T „pomoćničkih” stanica uz manjak supresorskih T limfocita te aktivacija intestinalnih makrofaga i otpuštanje proinflamatornih citokina. Antigenom aktivirane prezentirajuće stanice, makrofazi i dendritične stanice, induciraju Th1 tip imunog odgovora sekrecijom interleukina 12 (IL-12) i interleukina 23 (IL-23). Posljedično, aktivirani CD4⁺ T limfociti u Crohnovoj bolesti pojačano ekspimiraju najsnažnije proinflamatorne citokine: IL-1, faktor nekroze tumora α (TNF- α) te interferon γ (IFN- γ). Povišene vrijednosti navedenih citokina nađene su kako u serumu tako i u mukozi inflamiranog crijeva (3). Limfocitna akumulacija u mukozi crijeva i rezistencija aktiviranih T stanica na apoptozu pogoduju održavanju kronične upale. Svaki čimbenik i stadij u upalnom procesu potencijalno su mjesto terapijske intervencije.

1.2.2. Genetika

Nedavno otkriven NOD2/CARD15 gen na 16. kromosomu (IBD1 lokus), susceptibilan je za Crohnovu bolest, a povezuje se s ilealnom lokalizacijom i stenoziirajućim oblikom bolesti te njezinom dijagnozom u ranoj životnoj dobi (3). Louis i suradnici (9) su pokazali kako se duljim trajanjem bolesti povećava vjerojatnost promjene fenotipa bolesti iz inflamatornog oblika u stenoziirajući ili fistulirajući. Ipak, povezanost stenoziirajućeg oblika bolesti i NOD2/CARD15 genotipa potvrdilo je više istraživačkih grupa (10,11,12). K tome, u radu Mirze i suradnika (13) utvrđen je sinergistički efekt mutacije gena IBD5 lokusa i NOD2 gena na početak bolesti u ranijoj životnoj dobi. Mutacije NOD2 gena prisutne su u otprilike trećine bolesnika (4), a poznate su tri glavne varijante polimorfizma pojedinih nukleotida (SNP8, SNP12, SNP13). Nekoliko je poznatih pretpostavki kojima se objašnjava uloga NOD2 gena u patogenezi Crohnove bolesti. Muramil dipeptid (MDP) je minimalni strukturni dio peptidoglikana, komponente

stanične membrane gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Protein NOD2 gena unutarstanični je receptor za MDP. Unutarstanični NOD receptori i transmembranski Toll-like receptori (TLR) ključni su čimbenici u prepoznavanju patogenih molekula (engl. *PAMP's pathogen-associated molecular patterns*), aktivaciji urođenog (nespecifičnog) imunog sustava i održavanju mukozne homeostaze. NOD2 gen se eksprimira u monocitima/makrofazima i intestinalnim epitelnim stanicama, posebice Panethovim stanicama u bazi intestinalnih kripti. Čini se kako je u mutiranoj varijanti gena insuficijentna produkcija i sekrecija antibakterijskih peptida iz Panethovih stanica, primarno defensina, što omogućuje bakterijsku proliferaciju i posljedično kroničnu upalu (3-5). Najveća koncentracija Panethovih stanica upravo je u ileumu, čime se objašnjava i najučestalija lokalizacija bolesti – terminalni ileitis. Prema drugoj hipotezi, protein NOD2 gena ključan je regulator aktivacije nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) u odgovoru prema aktivnosti Toll-like receptora 2 (TLR2). Transmembranski TLR2 aktiviran MDP-om potiče aktivaciju NF- κ B. „Divlji tip“ (engl. *wild type*) NOD2/CARD15 gena inhibira prekomjernu aktivaciju NF- κ B, dok je u mutiranom tipu navedena inhibicija nedostatna. Stoga dolazi do prekomjerene aktivnosti transkripcijskog faktora NF- κ B i posljedično stimulirane produkcije proinflammatoryh citokina u nosioca mutiranog gena (4,5). Iznesene pretpostavke teorije „gubitka funkcije“ potvrđene su i u istraživanju Watanabe i kolega (14) na CARD15 mišjem modelu. U trećoj alternativnoj hipotezi (teorija „pojačanja funkcije“) direktna interakcija muramil dipeptida i unutarstaničnog NOD2 receptora stimulira aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B što ima za posljedicu pojačanu sekreciju proupalnih citokina i kroničnu intestinalnu upalu (4,5). Ova je pretpostavka u skladu s istraživanjem Maedae (15) na knock-in mišjem modelu. Studije na humanim stanicama uglavnom podupiru teoriju „gubitka funkcije“ s prekomjernom aktivacijom NF- κ B i stimuliranom citokinskom produkcijom (16,17,18). Osim NOD2/CARD15 identificirani su i drugi geni s određenom implikacijom na razvoj upalnih bolesti crijeva. Između ostalih to su citokin klaster geni (OCTN1/2) na IBD5 lokusu 5. kromosoma koji se povezuju s početom bolesti u ranoj životnoj dobi te neki drugi poput DLG5 i NOD1/CARD4 (tablica 1).

Tablica 1.

Gensko-fenotipske poveznice u upalnim bolestima crijeva

Lokusi	Kromosomske regije	Povezanost s tipom bolesti	Potencijalni (kandidatni) geni	Fenotipske korelacije
IBD1	16q12	CD	CARD15/NOD2	Rani početak bolesti, bolest tankog crijeva i sklonost strikturama
IBD2	12q13	Nedeterminirani kolitis i terminalni ileitis u CD	VDR, NRAMP2, STAT6 i MMP-18	Nije poznata
IBD3	6p13	CD i UC	Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC) i TNF	Nije poznata
IBD4	14q11	CD	TCR α / δ , leukotrienski B4 receptor, glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC) tip I, antigen prezentirajući proteosomski klaster	Nije poznata
IBD5	5q	Nedeterminirani kolitis, Crohn kolitis i ileokolitis	Citokinski klaster geni (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13; IRF-1 i CSF-2)	Perianalna bolest i rani početak bolesti
IBD6	19p	CD	ICAM-1 i DDXL	Nije poznata
IBD7	1p	CD i UC	Mucin 3, EGFR i HGF	Nije poznata

Tablica preuzeta iz Annals of Internal Medicine (4)

* CARD = kaspasa-aktivirajuća i regrutirajuća domena; CD = Crohnova bolest; CSF-2 = kolonija-stimulirajući faktor isoforma-2; DDXL = DEAD/DEAH helikaze; EGFR = receptor epidermalnog faktora rasta; HGF = hepatocitni faktor rasta; IBD = upalne bolesti crijeva; ICAM-1= intracelularna adhezijska molekula-1; IL = interleukin; IRF-1 = interferon regulirajući faktor isoforma-1; MMP = matrix metaloproteinaze; NRAMP2 = makrofagni protein 2 povezan s prirodnom otpornošću; STAT = provoditelj signala i aktivator transkripcije; TCR= T-stanični receptor; TNF = tumor nekrotizirajući faktor; UC = ulcerozni kolitis; VDR = vitamin D receptor.

1.3. KLINIČKA SLIKA

Upalne se bolesti crijeva manifestiraju različitim rasponom kliničkih slika, od onih klasičnih do manje karakterističnih kroničnih upala, neprepoznatljivog i nepredvidivog tijeka (1). Raznolikost prezentacije Crohnove bolesti proizlazi iz činjenice da bolešću može biti zahvaćen bilo koji segment probavnog trakta do anusa. Prezentacija bolesti blažim ili nekarakterističnim simptomima te nižim stupnjem aktivnosti često ima za posljedicu odgođeno traženje liječničke pomoći i kasno postavljanje dijagnoze. U svojem klasičnom obliku Crohnova se bolest javlja u mlađih bolesnika najčešće abdominalnim bolovima, proljevastim stolicama i gubitkom tjelesne težine te ponekad vrućicom uslijed upale, fistuliranja ili formiranja apscesa. Abdominalni su bolovi odraz opstruktivnih smetnji. Proljevi nastaju zbog upale, odnosno resekcije tankog crijeva i posljedičnog gubitka žučnih kiselina, a u slučaju zahvaćanja debelog crijeva zbog poremećene apsorpcije i sekrecije vode i elektrolita. Ispadi većih crijevnih segmenata ileuma mogu dovesti i do steatoreje uslijed nemogućnosti jetre da kompenzira prekomjerni gubitak žučnih kiselina. Za razliku od ulceroznog kolitisa krvarenja stolicom rijetko se pojavljuju u Crohnovoj bolesti, i to uglavnom kod kolitisa, odnosno ileokolitisa. U manjeg broja bolesnika početni su simptomi povezani s lokalnim komplikacijama ili ekstraintestinalnim manifestacijama. U četvrtine bolesnika bolest se javlja u djetinjstvu ili pubertetu i tada u kliničkoj slici dominira gubitak tjelesne težine, anemija, zaostajanje u rastu i često izvancrijevne manifestacije, posebice artritis (1).

Karakteristika je Crohnove bolesti segmentalna, diskontinuirana upala („skip“ lezije) koja zahvaća cijelu debljinu crijeвне stijenke. U početnom stadiju bolesti na normalnoj se sluznici nalaze aftozne ulceracije koje se kasnije prodube i konfluiraju te nastaju duboke, linearne fisure. Ulceracije i fisure omeđuju nezahvaćenu, zdravu sluznicu dajući joj karakterističan izgled „popločane ulice“. Na kraju se formiraju granulomi bez kazeozne nekroze koji sadržavaju epitelioidne i multinuklearne divovske stanice. Karakteristični granulomi javljaju se u otprilike polovice bolesnika i korisni su, ali ne i nužni za postavljanje dijagnoze.

1.3.1. Crohnova bolest jednjaka, želuca i dvanaesnika

Među najrjeđe lokalizacije bolesti ubrajamo one gornjeg gastrointestinalnog trakta. Bolešću je jednjak zahvaćen u otprilike 1-2% bolesnika, iako se u literaturi spominju i veći rasponi (2). Izolirana bolest jednjaka je vrlo rijetka, češća je u kombinaciji s bolešću tankog i/ili debelog crijeva. Najčešće se prezentira disfagijom ili odinofagijom te simptomima nalik GERB-u. Crohnova bolest želuca i dvanaesnika javlja se u do 5% bolesnika, a manifestira se dispepsijom, abdominalnim bolovima, mučninom i povraćanjem te gubitkom težine. Izolirana gastroduodenalna bolest je opisivana, no većina tih bolesnika u kasnijem tijeku razvije i bolest distalnog dijela probavnog sustava.

1.3.2. Bolest tankog crijeva

U 30-40% bolesnika upalom je zahvaćeno samo tanko crijevo, a u 40-55% bolest istovremeno zahvaća tanko i debelo crijevo (1). Izolirana je Crohnova bolest jejunuma rijetka, u najvećem broju slučajeva radi se o difuznom jejunoileitisu koji većinom zahtjeva jednu ili više kirurških operacija (2). Crohnova bolest ima predilekciju za segment terminalnog ileuma koji je upalno promijenjen u više od 70% slučajeva i tada se manifestira ranije spomenutom klasičnom kliničkom slikom. Terminalni ileum može biti zahvaćen u 30% bolesnika izolirano, odnosno kao difuzni jejunoileitis, dok se u otprilike 40% bolest širi na cekum i ascendentni kolon. Kao posljedica bolesti tankog crijeva, osobito jejunuma, javlja se malnutricija, malapsorpcija, oksalatni kamenci urotrakta i žučni kamenci (1,2,19). Malnutricija nastaje uslijed malapsorpcije i smanjenog unosa hrane. Anemija kao česta komplikacija bolesti nastaje ne samo zbog gubitka krvi sluznicom već i zbog malapsorpcije vitamina B₁₂ i folne kiseline te utjecaja kronične upale na eritropoezu. Kod upale, odnosno resekcije terminalnog ileuma i posljedične malapsorpcije žučnih soli te uslijed povećane litogenosti žuči nastaju žučni kamenci i oksalatni nefroliti. Deficit vitamina topivih u mastima također je prisutan u bolesti ili resekciji ileuma. Malapsorpcija vitamina D može dovesti do hipokalcemije i posljedične osteomalacije, a deficit vitamina K izaziva hipoprotrombinemiju i hemoragični dijatezu.

1.3.3. Bolest debelog crijeva

Preostali bolesnici (15-25%) imaju neki oblik kolitisa odnosno perianalnu bolest (do 30%). Crohn kolitis se javlja u nekoj od tri kliničke forme: ileokolitis, lijevostrani (distalni) kolitis odnosno totalni kolitis (pankolitis). Simptomi Crohn kolitisa uključuju abdominalne bolove, gubitak težine i manje ili više izražene proljevaste stolice s primjesama krvi. Diferencijalno dijagnostička teškoća postoji prema ulceroznom kolitisu obzirom na različite terapijske pristupe, posebice ako uključuju kirurške intervencije. Nekadašnja pretpostavka o poštediti rektuma u Crohnovoj bolesti u usporedbi s ulceroznim kolitisom više nije aktualna. Rektum je zahvaćen u čak 50-60% bolesnika s Crohn kolitisom i u trećine onih koji su inicijalno imali pošteđenu navedenu regiju (2). Kod perianalne bolesti najveći broj bolesnika ima zahvaćen kolon, bilo izolirano ili kao ileokolitis.

1.3.4. Perianalna bolest

Simptomi perianalne bolesti variraju od kožnih promjena preko fisura do fistula i apscesa. Kožne edematozne promjene, u početku asimptomatske, kasnije mogu fibrozirati i zahtijevati kiruršku eksciziju. Fisure u većini slučajeva spontano cijele uz higijenske mjere. Perianalne fistule dijelimo na jednostavne i kompleksne, a klasificiraju se prema lokalizaciji u odnosu na analni sfinkter. Vrućica ili bolnost u zdjelici upućuju na pojavu fistule, odnosno apscesa, koji se najpouzdanije mogu dijagnosticirati kombinacijom pregleda u anesteziji i MR zdjelice. Jednostavne fistule tretiraju se konzervativno antibioticima i/ili imunomodulatorima, dok je kirurško liječenje (postavljanje „setona“ ili fistulotomija) terapijski odabir u slučaju prisutnih simptoma (20). Kompleksne fistule liječe se kombinacijom antibiotika i/ili imunomodulatorima uz kirurške intervencije drenaže apscesa, fistulotomiju odnosno postavljanje setona (20). Kod takvih je fistula druga linija terapije liječenje anti-TNF protutijelima. Neperianalne fistule poput enteroenteralnih često su asimptomatske i najčešće lokalizirane između ileocekalne regije i sigme. Entero- odnosno rektovaginalne fistule, ako su simptomatske, prezentiraju se dispareunijom i fekulentnim vaginalnim iscjetkom. Simptomatske fistule pokušava se prvo liječiti

konzervativno, a u slučaju neuspjeha kirurškom preklopnicom (*engl.* „flap“), odnosno resekcijom zahvaćenog crijevnog segmenta. Slično se tretiraju i enterokutane fistule koje se uglavnom javljaju u prvim danima nakon operacije, a manifestiraju se vrućicom i lokalnim znakovima upale. Spontane enterokutane fistule javljaju se obično u području prethodnog operativnog ožiljka, a rijetko na intaktnoj abdominalnoj stijenci. Enterovezikalne fistule karakterizirane su recidivnim uroinfektima, dizurijom, pneumaturijom i fekalurijom, a njihovo liječenje je prvenstveno kirurško.

1.3.5. Klinički tijek i ponašanje bolesti

Prema kliničkom tijeku i ponašanju Crohnove bolesti Bečka klasifikacija razlikuje tri podgrupe: bolesnike s pretežno inflamatornim tipom bolesti, strikturirajućim tipom, te penetrirajućim (fistulirajućim) oblikom bolesti. Ista klasifikacija dijeli bolesnike na one s početkom bolesti prije i nakon 40. godine života. Skupina s početkom bolesti u ranijoj životnoj dobi povezuje se s pozitivnom obiteljskom anamnezom upalnih bolesti crijeva te zahvaćanjem i komplikacijama na tankom crijevu. Kod bolesnika s početkom bolesti nakon 40. godine života učestaliji je kolitis, a rjeđe se pojavljuju komplikacije u smislu stenoza i fistula.

Inflamatorni tip, odnosno nestrikturirajući-nepenetrirajući oblik bolesti karakteriziran je dominantno upalom s površinskim ulceracijama bez formiranja fistula, apscesa ili striktura. U kliničkoj slici prevladavaju proljevaste stolice i abdominalna bol. U preostala dva oblika također postoji komponenta upale koja međutim nije dominirajuća. Nedavno objavljene studije, između ostalog ona Louisa i sur. (9), govore u prilog progresije većeg broja bolesnika iz inicijalno nestrikturirajuće-nepenetrirajućeg oblik bolesti u stenozirajući odnosno penetrirajući trajanjem bolesti.

U strikturirajućem tipu bolesti u početku dolazi do intermitentnih opstrukcija zbog edema i spazma crijeвне stijenke. Uslijed upale i trajanja bolesti razvijaju se strikture koje prvo reduciraju proljevaste stolice, a potom nastupa opstipacija uz prestenotičku dilataciju.

Penetrirajući, odnosno fistulirajući tip bolesti posljedica je zahvaćanja cijele debljine crijevne stijenke upalom i njezinog širenja kroz serozu. Rjeđe se ovaj oblik bolesti prezentira akutnom perforacijom šupljeg organa. Češća je subakutna klinička slika s formiranjem fistula odnosno apscesa. Fistule djelimo na perianalne i neperianalne obzirom na različite terapijske pristupe. Procjenjuje se da je rizik razvoja fistula u bolesnika s Crohnovom bolesti tijekom života od 20-40% (2).

1.3.6. Procjena aktivnosti bolesti

Za procjenu aktivnosti bolesti koriste se brojni indeksi kojima se nastoji objektivizirati upalna aktivnost, bilježe se subjektivni simptomi i klinički znakovi, a neki koriste i laboratorijske parametre. Navedeni indeksi koristan su pokazatelj kliničaru pri odabiru terapije i procjeni njezine učinkovitosti. Treba naglasiti da upalna aktivnost izražena biokemijskim parametrima nije nužno u korelaciji sa subjektivnim simptomima i fizikalnim znakovima.

Jedan od najčešće upotrebljavanih indeksa CDAI (*Crohn's disease activity index*) (21) i Harvey-Bradshawov indeks (22) mjere subjektivne simptome i objektivne kliničke znakove. CDAI uključuje sedmodnevno praćenje slijedećih parametara: broj stolica, abdominalna bol, opće stanje bolesnika, upotreba opijata za kontrolu proljeva, palpabilna abdominalna masa, hematokrit, tjelesna težina i izvancrijevni simptomi. Sve varijable se umnože s pripadajućim koeficijentima i na kraju zbroje. Ukupni zbroj ispod 150 odgovara blagoj bolesti, odnosno remisiji. Vrijednosti oko 220 odgovaraju umjereno teškoj bolesti, dok zbroj preko 450 upućuje na tešku Crohnovu bolest. Iako je CDAI reproducibilan i relativno pouzdano prikazuje aktivnost bolesti zbog kompleksnosti izračunavanja i potrebe sedmodnevnog praćenja nije pogodan za svakodnevnu kliničku upotrebu. Pojednostavljeni indeks koji koristi pet od osam parametara iz CDAI i ne zahtjeva sedmodnevno praćenje je Harvey-Bradshawov indeks. Za razliku od prethodnih indeksa Van Hees indeks (nizozemski indeks) (23) koristi i laboratorijske parametre unutar devet ispitivanih varijabli. Time postiže veću objektivnost i bolje korelira s procjenom kliničara, no svakodnevna je upotreba ograničena kompleksnim izračunom. Subjektivni upitnici o kvaliteti života

orijentirani su prvenstveno na bolesnikove simptome i emocionalno stanje za razliku od prethodno navedenih indeksa.

1.4. IZVANCRIJEVNE MANIFESTACIJE BOLESTI

Upalne bolesti crijeva povezane su s izvancrijevnim manifestacijama koje mogu zahvatiti gotovo svaki organski sustav (tablica 2). Ekstraintestinalne manifestacije javljaju se u otprilike 20-40% svih bolesnika s upalnim bolestima crijeva, a učestalost im ovisi o fenotipu bolesti crijeva i zahvaćenom organu (17). Najučestalije su zahvaćeni zglobovi, koža, oči i bilijarni sustav. Neke izvancrijevne manifestacije poput perifernog artritisa, nodoznog eritema, pyoderme gangrenosum i episkleritisa koreliraju s intenzitetom upale crijeva. Navedene manifestacije regrediraju smirivanjem upale. S druge strane primarni sklerozirajući kolangitis, uveitis, ankilozni spondilitis i sakroileitis nisu povezani s upalnom aktivnošću u crijevu.

1.4.1. Patogeneza izvancrijevnih manifestacija

Patogeneza izvancrijevnih manifestacija upalnih bolesti crijeva nije u potpunosti razjašnjena. Više studija ukazuje na povezanost genetskih i imunoloških čimbenika s razvojem izvancrijevnih manifestacija. Polimorfizam NOD2/CARD15 gena koji je ranije spomenut povezuje se s ilealnom lokalizacijom i stenoziirajućim oblikom Crohnove bolesti. Osim povezanosti s navedenim fenotipom bolesti polimorfizam NOD2 gena dovodi se i u vezu sa sakroileitisom (25). Samo je jedna studija (26) pokazala slabu inverznu korelaciju mutacije NOD2 gena i izvancrijevnih manifestacija u cjelini dok ostale nisu utvrdile ikakvu povezanost. Međutim, nedostatak većine studija upravo je koreliranje izvancrijevnih manifestacija u cjelini, a ne pojedinačno. Dva različita tipa perifernog artritisa koja se javljaju u upalnim bolestima crijeva prema Orchardu i sur. (27) povezuju se s različitim genotipovima. Tip 1 artritisa koji se javlja intermitentno i zahvaća do pet zglobova povezuje se s HLA-B 27, HLA-B 35 i HLA-DRB1*1013. Tip 2 artritisa povezan je s HLA-B 44 haplotipom. Očne i kožne promjene također se dovode u vezu s određenim HLA. Iz navedenog se

može pretpostaviti kako je za razvoj izvancrijevnih manifestacija potrebna specifična genetska podloga.

Autoimunost ima centralnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva i pridruženim izvancrijevnim manifestacijama. To je potvrđeno nalazima autoantitijela u bolesnika te uspješnim liječenjem izvancrijevnih manifestacija imunomodulatornom lijekovima. Poremećeni imuni odgovor na strani antigen dovodi do T stanične aktivacije i indukcije Th 1 imune reakcije s posljedičnom citokinskom produkcijom i stvaranjem autoantitijela. Zbog antigenske mimikrije aktivirani T limfociti mogu križno reagirati s autoantigenima. Poznata je križna reaktivnost između epitelnog proteina kolona (p40) i epitopa cilijarnog epitela u očima, epitela bilijarnog trakta i hondrocita (28).

Tablica 2.

Izvancrijevne manifestacije u upalnim bolestima crijeva

Hepatobilijarne - Steatoza jetre - Kolelitijaza - Primarni sklerozirajući kolangitis - Kronični hepatitis - Granulomatozni hepatitis - Ciroza jetre - Kolangiocelularni karcinom - Pankreatitis - Hemosideroza Muskuloskeletne - Periferna artropatija - Sakroileitis - Ankilozni spondilitis - Hipertrofična osteoartropatija - Polihondritis - Zdjelični osteomijelitis - Avaskularna nekroza - Metastatska Crohnova bolest kostiju, zglobova i mišića	Kardiovaskularne - Perikarditis - Miokarditis - Endokarditis Endokrine - Osteomalacija - Osteopenija - Osteoporoza - Deficit vitamina i minerala u tragovima - Hipo- i hipertiroidizam Očne manifestacije - Episkleritis - Uveitis - Konjuktivitis - Retinitis - Retrobulbarni neuritis - Katarakta - Glaukom - Orbitalni miozitis - Orbitalni celulitis - Okluzija a. i v. retine Usna šupljina - Aftozni stomatitis - Piodontitis - Vegetans - Orofacijalna granulomatoza	Kožne promjene - Erythema nodosum - Pyoderma gangren. - Pyoderma vegetans - Sweet sindrom - Erythema multiforme - Psorijaza - Steven-Johnson sind. - Rosacea fulminans - Kožni poliarteritis nodosa - Metastatska Crohnova bolest kože Hematološke - Anemija kr. bolesti - Anemija zbog deficita Fe, folata ili vit. B₁₂ - Autoimuna hemolitička anemija - Tromboembolijska bolest - Mijelodisplastički sind. Neurološke - Periferna neuropatija - Mijelopatija - Myasthenia gravis - Demijelinizirajuća radikulopatija - Rekurentne TIA-e - Epilepsija	- Mononeuritis - Cerebrovaskularni incidenti - Leukoencefalitis - Cerebelarna degeneracija Bubrežne - Nefrolitijaza - Amiloidoza - Intersticijski nefritis - Renalna tubularna acidoza - Glomerulonefritis - Nefrotoksičnost lijekova - Enterovezikalne fistule - Opstruktivna uropatija Plućne - Bronhilitis - Kr. Bronhitis - Bronhiektazije - Granulomatozni pneumonitis - Intersticijska fibroza - Pleuritis
---	---	--	---

1.4.2. Manjak koštane mase (osteopenija) i osteoporoza

Koštano se tkivo tijekom životnog vijeka kontinuirano pregrađuje. To je fiziološki koordinirana aktivnost dvaju glavnih staničnih elemenata: osteoblasta koji sintetiziraju koštani matriks i osteoklasta koji sudjeluju u njegovoj resorpciji. Osteoklasti, stanice monocitnog podrijetla, resorbiraju koštano tkivo djelovanjem različitih enzima poput katepsina K. Osteoblasti oblažu tako nastale resorptivne šupljine osteoidom koji se potom mineralizira. Za održavanje normalne homeostaze nužna je uravnotežena aktivnost osteoblasta i osteoklasta. Poremećaji u kojih dominira aktivnost osteoklasta vode k lokalnom ili generalnom gubitaku koštane mase. Smanjenje gustoće koštanog tkiva je obilježje mnogih bolesti, a mogu ga uzrokovati različiti čimbenici poput metaboličkih poremećaja, kronični upalni procesi, genska predispozicija, promjene na hormonalnoj razini do terapije kortikosteroidima ili pušenje i konzumiranje alkohola.

Klasična denzitometrija je zlatni standard za određivanje koštane mase mjerenjem mineralne gustoće kosti. Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije izmjerene vrijednosti izražavaju se kao odstupanja od prosjeka zdrave populacije (T-vrijednost) odnosno odstupanje od kontrolne skupine prema dobi i spolu (Z-vrijednost). Kriterij Svjetske zdravstvene organizacije za osteoporozu je T-vrijednost $< -2,5$, dok se manjak koštane mase (osteopenija) smatra T- vrijednost između -1 i $-2,5$. Sve vrijednosti mineralne gustoće kosti veće od -1 klasificiraju se kao normalna koštana masa. U osteoporozi su serumske vrijednosti kalcija, vitamina D i fosfata kao esencijalnih elemenata u metabolizmu kosti uglavnom normalne. Navedeni parametri najčešće su sniženi u osteomalaciji kada je poremećena mineralizacija osteoida.

1.4.3. Metabolizam koštanog tkiva u upalnim bolestima crijeva

U bolesnika s Crohnovom bolesti opisane su koštane promjene koje sežu od osteopenije do osteoporoze s posljedično povećanim rizikom koštanih prijeloma. Podaci denzitometrijskog mjerenja koštanog statusa u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva pokazuju manjak koštane mase (osteopenija) u 40-50% bolesnika. Prevalencija osteoporoze kod upalnih bolesti

crijeva u nekontroliranim studijama kreće se od 18-42% prema Bernstein i sur. (29). Istraživanja pokazuju nešto veću učestalost koštane bolesti u Crohnovoj bolesti u usporedbi s ulceroznim kolitisom. Etiologija metaboličke bolesti kostiju u Crohnovoj bolesti nije u potpunosti jasna, ali se zna da u patogenezi značajnu ulogu imaju kronična remitentna upala i terapija steroidima (29).

Posljednjih se godina intenzivnije raspravlja o riziku koštanih prijeloma u upalnim bolestima crijeva nego o samoj prevalenciji osteoporoze. Rezultati studija o koštanim prijelomima su donekle proturječni. Ukupni relativni rizik koštanih prijeloma u upalnim bolestima crijeva veći je 40% u odnosu na opću populaciju (29). Neke studije (30,31) navode povećani rizik prijeloma u bolesnika s Crohnovom bolesti dok druge (32) ne navode signifikantnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu. Asimptomatske frakture kralješnice nisu rijetka komplikacija u Crohnovoj bolesti. Pojedina istraživanja bilježe njihovu pojavu u čak 22% bolesnika (33,34). Prijelomi se uglavnom javljaju u mlađoj dobi u bolesnika s metaboličkom bolesti kostiju za razliku od onih bez metaboličke bolesti kostiju. Neki podaci ukazuju na učestaliju pojavu prijeloma kralješnice u bolesnika s višim stupnjem aktivnosti bolesti određenim vrijednošću CRP-a.

Bolesnici s Crohnovom bolesti imaju nekoliko rizika za razvoj osteoporoze: mogući deficit vitamina D i kalcija, ekcesivnu upotrebu kortikosteroida, smanjenu gonadalnu funkciju i upalnu komponentu bolesti. Starije studije ukazuju na nedostatak vitamina D u većine bolesnika s Crohnovom bolesti (35) uglavnom zbog malapsorpcije, odnosno crijevne resekcije. Nedavna studija Vogelsanga i sur. (36) pokazala je, kontradiktorno dugogodišnjoj dogmi, kako je apsorpcija vitamina D u Crohnovoj bolesti uredna. Neke druge studije poput one Andreassena i sur (37) nisu utvrdile povezanost mineralne gustoće kosti i serumskih vrijednosti 25-OH vitamina D. K tome, reducirana mineralna gustoća kosti nađena je i u bolesnika koji su imali normalne vrijednosti vitamina D (38). Iz navedenog proizlazi kako nedostatak vitamina D, ako je uopće prisutan, nije vodeći uzrok osteoporoze u bolesnika s Crohnovom bolesti.

Poznato je kako steroidi negativno djeluju na kost slabljenjem funkcije osteoblasta, a potičući osteoklastičnu resorpciju putem IL-1. Osim toga, induciraju sekundarni hiperparatireoidizam, reduciraju crijevnu apsorpciju kalcija

(putem vitamina D) i povećavaju njegovo bubrežno izlučivanje. Brojne su studije utvrdile inverznu korelaciju između mineralne gustoće kosti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i ukupne doze steroida primljene tijekom života.

Amenoreja i hipogonadizam su učestali u bolesnika s upalnim bolestima crijeva najvjerojatnije kao posljedica inhibitorynog djelovanja osnovne bolesti i steroidne terapije na hipofizno-gonadalnu osovinu.

Ne smiju se zanemariti dob, spol niti indeks tjelesne mase koji zajedno sa svim ranije spomenutim čine profil rizičnih faktora za nastanak i razvoj metaboličke bolesti kostiju kao sekundarne komplikacije upalnih bolesti crijeva (39).

Povezanost kroničnih upalnih bolesti s osteoporozom upućuje na fenomen da aktivirani imunološki sustav ima upliva na patološke promjene u koštanom metabolizmu, pri čemu vrlo nepovoljno djeluju učestali relapsi, odnosno duge faze aktivnog oblika bolesti. Interakcija na leukocitima eksprimiranog $\alpha 4\beta 1$ integrina i fibronektina stimulira ekspresiju matriks metaloproteinaza koje razgrađuju i modificiraju izvanstanični matriks i time pomažu migraciju leukocita u upali (7). Hipotetski, navedenom interakcijom potaknuta razgradnja izvanstaničnog matriksa može se odvijati i u kosti djelujući na smanjenje koštane mase. Stanice osteoklasta imaju središnju ulogu u patološkom propadanju koštanog tkiva. Najnovija istraživanja u biologiji osteoklastogeneze pridaju značajnu ulogu signalnom putu koji čine RANK (*engl.* receptor activator of nuclear factor-kappa B), RANK-ligand i osteoprotegerin (40). RANK-ligand se veže i pri tome aktivira RANK receptor na membrani osteoklastičnih prekursora čime se aktivira sazrijevanje osteoklasta. Osteoprotegerin (OPG) je nativni inhibitor RANK-liganda s kojim tvori kompleks OPG-RANKL inhibirajući tako njegovo vezanje za osteoklastični receptor. Uravnoteženost signalnog sistema RANK-ligand/RANK/OPG nužna je za održavanje normalne koštane homeostaze. Također je opisana funkcionalna povezanost ovog signalnog puta i imunološkog sustava (41,42). Stanice T limfocita, aktivirane spajanjem antigena s receptorom, na svojim membranama eksprimiraju RANKL koji se djelovanjem metaloproteinaza isplavljuje u cirkulaciju. RANK-ligand deriviran iz T limfocita direktno potiče sazrijevanje osteoklastičnih progenitora u zrele osteoklaste te dalje promovira osteoklastogenične aktivnosti u smislu koštane

resorpcije. Naime, aktivirani T limfociti sintetiziraju i luče proupalne citokine (IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α), enzime i faktore rasta, koji opet induciraju ekspresiju RANK-liganda na stanicama osteoblasta. Stoga sistemno aktiviranje T limfocita izravno utječe na biogenezu i aktivnost osteoklasta pri čemu su T limfociti ključni posrednik u smanjenju koštane mase *in vivo*.

1.4.4. Terapija metaboličke bolesti kostiju

Opći terapijski ciljevi jesu prevencija gubitka koštane mase, kontrola upalne aktivnosti bolesti, održavanje adekvatnog nutritivnog statusa, upotreba niskih doza steroida, uključivanje imunomodulatornih lijekova kao supstitucija za steroide i prevencija prijeloma kod bolesnika s potvrđenom osteoporozom.

Osnovne terapijske mjere kod svih bolesnika uključuju adekvatan dnevni unos kalcija (1200-1500 mg) i vitamina D (800 IU) uz redovitu tjelovježbu (vježbe snage), prestanak pušenja i izbjegavanje uživanja alkohola. Terapija bisfosfonatima savjetuje se bolesnicima s dokazanom osteoporozom. U bolesnika s manjkom koštane mase (osteopenija, T-vrijednost između -1 i -2,5) bisfosfonati su terapija izbora u slučaju prolongiranog liječenja steroidima. Kontrolna denzitometrija nakon 1-2 godine savjetuje se kod svih bolesnika radi potvrde stabilizacije koštane mase.

1.5. DIJAGNOZA BOLESTI

Postavljanje dijagnoze Crohnove bolesti često zahtjeva kompleksan dijagnostički pristup. Naime, bolest se može prezentirati šarolikom kliničkom slikom odnosno samo izvancrijevnim manifestacijama ili lokalnim komplikacijama. Stoga, dijagnostički algoritam uključuje laboratorijske parametre, radiološke i endoskopske pretrage te histološku analizu biopsiranog ili resektiranog tkiva.

1.5.1. Laboratorijski nalazi

Neki laboratorijski parametri koristan su pokazatelj aktivnosti bolesti. Tako se u aktivnoj upali često nalazi ubrzana sedimentacija eritrocita (SE), leukocitoza,

povišene vrijednosti CRP-a, fibrinogena, α 1-antitripsina i trombocita (43). Navedeni su parametri nespecifični znakovi upalne aktivnosti. Ubrzana sedimentacija eritrocita nije samo odraz upalne aktivnosti u crijevu već i promjene koncentracije plazmatskih proteina te staničnog volumena. Poznato je kako SE slabo korelira s intenzitetom bolesti ileuma, a nešto bolje s Crohnovom bolesti debelog crijeva (2,43). Nasuprot tome, CRP i serumski amiloid A (SAA), također reaktant akutne upale, dobri su pokazatelji intenziteta upalne aktivnosti. Oba parametra dobro koreliraju s CDAI, dok neke studije daju malu prednost SAA (2).

Često prisutna anemija može biti uzrokovana kroničnim krvarenjem iz sluznice, malapsorpcijom vitamina B₁₂, deficitom folne kiseline ili pak djelovanjem kronične upale na koštanu srž. Kod težih oblika bolesti kao posljedica toksemije ili malnutricije na jetru mogu se registrirati hipoalbuminemija i blaži porast jetrenih enzima praćeni deficitom kalija, kalcija, fosfata i magnezija.

Serološki markeri mogu biti dodatna pomoć u diferencijalnoj dijagnozi između dva fenotipa upalne bolesti crijeva. Perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska antitijela (pANCA), karakteristična za Wegenerovu granulomatozu, pozitivna su u otprilike 10% bolesnika s Crohnovom bolesti i oko 65% bolesnika s ulceroznim kolitisom (2). Obično se radi o podgrupi bolesnika s primarno lijevostranim kolitisom i kliničkim tijekom nalik ulceroznom kolitisu. Prema nekim istraživanjima navedena grupa bolesnika ima slabi odgovor na terapiju infliksimabom. Antitijela na *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) pozitivna su u 60-70% bolesnika s Crohnovom bolesti i u manje od 15% bolesnika s ulceroznim kolitisom. Bolesnici koji imaju pozitivna IgG i IgA ASCA visoko su prediktivni za Crohnovu bolest i ilealnu lokalizaciju bolesti. Zaključno se može reći da je kombinacija ASCA⁺/pANCA⁻ specifična je za Crohnovu bolest. Od novijih seroloških markera treba spomenuti anti-OmpC, protutijela na porin vanjske membrane *E. coli* koja se javljaju u 55% bolesnika s Crohnovom bolešću i povezuju se s penetrirajuće tipom bolesti (44). Mikrobna sekvenca I2 identificirana je kao homolog tetR bakterijskog transkripcijskog faktora i prisutna je u dijela bolesnika s Crohn kolitisom. Navedena se sekvenca povezuje s *Pseudomonas fluorescens* (44). Anti-I2 antitijela klase IgA nađena su u 54%

bolesnika s Crohnom, 10% bolesnika s ulceroznim kolitisom, 19% bolesnika s drugim crijevnim upalama i 4% zdravih kontrola. Prisutnost navedenih protutijela povezuje se sa sklonošću stenozirajućem tipu bolesti (44). Anti-CBir1 flagelinska protutijela, prisutna u otprilike polovice bolesnika s Crohnom, dovode se u vezu s bolesti tankog crijeva te penetrirajućim i stenozirajućim oblikom bolesti (44). Buduće studije će pokazati pravu vrijednost novijih seroloških markera.

Radi isključenja specifičnih upala probavnog trakta indicirana je mikrobiološka, parazitološka i analiza stolice na gljivice. Posebnu pažnju treba posvetiti isključenju *Clostridium difficile* infekcije.

1.5.2. Dijagnostičke pretrage

Prvi je korak u dijagnostici procjena aktivnosti bolesti kliničkim pregledom i biokemijskim parametrima. Nativna RTG snimka abdomena koristi se radi isključenja mogućeg toksičnog megakolona, ileusa ili perforacije crijeva. Ako aktivnost bolesti i opće stanje bolesnika dozvoljavaju, slijedeći je dijagnostički postupak kolonoskopija s ileoskopijom. Naime, kao prvo je potrebno razlučiti fenotip i lokalizaciju upalne bolesti crijeva. Za razliku od ulceroznog kolitisa, Crohnova se bolest endoskopski prikazuje segmentalnim upalnim promjenama koje variraju od afti do dubokih ulceracija i fisura koje sluznici daju karakterističan izgled „popločane ulice“. Trajanjem i progresijom bolesti nastaju promjene u smislu pseudopolipa, stenoza i fistula. U slučaju nemogućnosti endoskopske evaluacije cijelog debelog crijeva (npr. neprohodne stenoze) kao pomoćna metoda može se koristiti irigografija barijevim kontrastom. Kako je u Crohnovoj bolesti terminalni ileum zahvaćen u više od 70% bolesnika ileoskopija je od izuzetne važnosti za postavljanje pravilne dijagnoze. U usporedbi s radiološkim pretragama ileoskopija je superiornija u dijagnozi Crohnove bolesti terminalnog ileuma (43).

Slijedeći je korak procjena proširenosti bolesti. Neovisno od endoskopskog nalaza u terminalnom ileumu, indicirana je evaluacija mogućih promjena u tankom crijevu, najčešće pasažom ili enteroklizom. Te pretrage omogućuju detaljnu analizu sluznice kao i prepoznavanje potencijalnih stenoza ili fistula.

Promjene su karakteristično segmentalne s oštrom granicom između zdravih i bolesnih dijelova. Osim navedenih pretraga mogu se u istu svrhu koristiti i CT/MR -enterokliza ili -enterografija. Posljednje pretrage kvalitetnije prikazuju zadebljanje crijevnih stijenki kao i vaskularne promjene mezenterija (43). „Push“ enteroskopija s uzimanjem biopsija sluznice je sigurna i korisna metoda u dijagnozi Crohnove bolesti kod dijela bolesnika u kojih konvencionalne radiološke tehnike nisu dale odgovarajuće rezultate (43). Kapsula endoskopija je relativno nova i neinvazivna pretraga za prikaz tankog crijeva. Uglavnom je indicirana u bolesnika sa sumnjom ili potvrđenom Crohnovom bolesti tankog crijeva, a bez prisutnih stenoza. Dodatne studije tek trebaju potvrditi vrijednost ove metode u dijagnostičkom algoritmu upalnih bolesti crijeva. Od endoskopskih pretraga treba još spomenuti gastroduodenoskopiju koja je indicirana u bolesnika sa simptomima gornjeg probavnog trakta.

Zbog učestalih komplikacija na bilijarnom i urotraktu potrebno je učiniti ultrazvučni pregled abdomena. Ta se pretraga može koristiti i kao metoda probira kod sumnje na apscesne kolekcije, iako je manje specifična od drugih radioloških tehnika te ovisna o iskustvu operatera. Stoga se u slučaju sumnje na apsces ili fistule savjetuje učiniti CT odnosno MR koja je još senzitivnija i k tome ne upotrebljava ionizirajuće zračenje (43). Kod perianalne bolesti s fistulama metoda s najvećom senzitivnošću je kirurški pregled u anesteziji, posebice ako se kombinira s MR zdjelice (20). Za procjenu upalne aktivnosti i komplikacija poput apscesa i fistula kod bolesnika koji nisu na steroidnoj terapiji, može se koristiti scintigrafija obilježenim leukocitima (^{99m}Tc -HMPAO) ili antileukocitnim protutijelima.

Fokalna kronična upala s redukcijom broja kripti, njihovom distorzijom, mukoznom atrofijom i pojavom granuloma generalno su prihvaćene histološke karakteristike Crohnove bolesti (43). Aftozne promjene odnosno ulceracije u Crohnovoj bolesti uvijek razdvaja zdrava sluznica za razliku od ulceroznog kolitisa koji ima slična histološka obilježja. Karakteristični granulomi javljaju se u otprilike polovice bolesnika s Crohnovom bolesti i korisni su, ali ne i nužni za postavljanje dijagnoze.

1.5.3. Diferencijalna dijagnoza Crohnove bolesti

Brojne su bolesti koje se mogu prezentirati kliničkom slikom upalnih bolesti crijeva. Između ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti kao dva osnovna fenotipa upalnih bolesti crijeva postoji određeno preklapanje kliničkih karakteristika. Svaka bolest zahtjeva specifičan terapijski pristup, stoga je od iznimne važnosti pravilno inicijalno određivanje fenotipa i proširenosti upalne bolesti crijeva. Osim ulceroznog kolitisa postoji veći broj bolesti koje mogu imitirati kliničku sliku Crohnove bolesti radi čega je bitno njihovo razlikovanje i pravovremeno dijagnosticiranje (tablica 3).

Tablica 3.

Diferencijalne dijagnoze upalnih bolesti crijeva

Infekcije-bakterijske	Maligne bolesti
- Shigella - Salmonella - Campylobacter jejuni - Yersinia enterocolitica - Clostridium difficile - Escherichia coli - Entamoeba histolytica - Mycobacterium tuberculosis - Mycobacterium avium intracellulare - Chlamydia trachomatis - Histoplasma	- Limfomi tankog crijeva - Adenokarcinomi tankog/debelog crijeva - Sarkom - Karcinoid - Metastatski tumori
	Kolitisi inducirani lijekovima/med. postupcima
	- Pseudomembranozni - NSAR - Oralni kontraceptivi - Postiradijacijski
Infekcije-virusne	Ostale bolesti
- Herpes simplex - Cytomegalovirus	- Divertikulitis - Akutni apendicitis - Ovarijalne ciste i tumori - Endometrioza - Lymphogranuloma venerum - Kolageni i limfocitni kolitis - Sarkoidoza - Celijakija
Vaskularne bolesti	
- Sistemni vaskulitisi - Behçetova bolest - Ishemični kolitis	

1.6. OSNOVE LIJEČENJA CROHNOVE BOLESTI

Prije početka liječenja ključna je procjena aktivnosti, fenotipa i proširenosti bolesti. Već su ranije navedene brojne bolesti (tablica 3) koje je potrebno isključiti prije započinjanja terapije. Terapijski je cilj postizanje i održavanje remisije bolesti. Dva su osnovna pristupa liječenju: „step-up“ i „top-down“ (1,45). Prvi pristup zagovara postupno dodavanje potentnijih lijekova ukoliko terapija prve linije nije učinkovita. „Top-down“ terapijski pristup je upravo obrnut i kao prva mogućnost se koriste najpotentniji, ali ujedno i najskuplji lijekovi.

1.6.1. Medikamentno liječenje

Crohnova bolest gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta iako rijetka povezuje se s lošijom prognozom. Liječenje se temelji na inhibitorima protonske pumpe uz dodatak steroida, odnosno dodatak imunomodulatora kod izraženijih simptoma (1,45). Infliksimab je alternativa kod refraktorne bolesti. Balon dilatacija ili kirurška terapija su mogućnosti kod težih opstruktivnih smetnji.

U blagoj je Crohnovoj bolesti lokaliziranoj ileocekalno preporučena terapija budesonidom (9mg/dan), dok je učinak mesalazina ograničen (45). Antibiotici se ne preporučuju.

Umjereno aktivna bolest iste lokalizacije također se može liječiti budesonidom ili sistemnim steroidima dok se antibiotska terapija uključuje u slučaju septičkih komplikacija (45).

Kod teške Crohnove bolesti ileocekalne regije indicirano je inicijalno liječenje steroidima, prvo parenteralno, potom peroralno. Kod ranog relapsa bolesti dodaje se azatioprin, odnosno u slučaju njegovog nepodnošenja metotreksat. Infliksimab je terapijska mogućnost kod bolesnika refraktornih na terapiju steroidima i/ili imunomodulatorima. Kirurški zahvat treba uzeti u obzir u slučaju neuspjeha medikamentne terapije unutar dva do šest tjedana (45).

U slučaju blagog Crohn kolitisa savjetuje se terapija aminosalicilatima ili sistemnim steroidima. Kod distalnog kolitisa u terapiji se isti lijekovi mogu primjenjivati lokalno ili se kombinirati sa sistemnom terapijom u ovisnosti o

aktivnosti bolesti. Kod ranog relapsa dodaju se imunomodulatori, a infliksimab je opcija u slučaju njihove intolerancije ili refraktorne bolesti.

Kod proširene bolesti tankog crijeva kada je zahvaćeno više od 100 cm crijeva indicirano je liječenje kortikosteroidima uz konkomitantnu terapiju imunomodulatorom radi smanjenja doze steroida (45). Također je indicirana nutritivna potpora. U slučaju neuspjeha terapije, slično kao i kod drugih lokalizacija bolesti, treba uzeti u obzir liječenje infliksimabom i kirurškim zahvatom.

Kod ranog relapsa, steroid ovisne i rezistentne bolesti savjetuje se upotreba imunomodulatora. Ciprofloksacin i metronidazol dovode do manje, neznačajne redukcije indeksa aktivnosti bolesti. Stoga se njihova upotreba preporuča u septičkim komplikacijama, bakterijskom prerastanju u crijevu i perianalnoj bolesti. Kod medikamentno (steroidima) postignute remisije za njezino održavanje savjetuje se azatioprin (45). Novije studije ukazuju i na postoperativno održavanje remisije azatioprinom. Mesalazin i kortikosteroidi se ne savjetuju za održavanje medikamentno postignute remisije.

Liječenje perianalne bolesti, posebice kompleksnih fistula je složeno i kombinira antibiotike i/ili imunomodulatore s kirurškim intervencijama (20). Druga linija terapije je infliksimab.

1.6.2. Nutritivna potpora liječenju

U bolesnika s upalnim bolestima crijeva, a posebice Crohnovom bolesti, učestala je malnutricija. Nutritivna potpora osobito je vrijedna u djece i adolescenata sa zastojem u rastu jer može modificirati tijek bolesti, a vrlo je korisna i u bolesnika koji se pripremaju za operativni zahvat. Enteralna prehrana ima prednost pred parenteralnom jer priječi atrofiju crijevnih resica i potencijalni nastanak septičnih komplikacija, a k tome omogućuje unos nekih probiotičkih bakterija (46). Primjena adekvatnog omjera jednostruko- prema višestrukonezasićenim masnim kiselinama u gotovim parenteralnim otopinama kao i enteralnim pripravcima smanjuje negativan utjecaj upalne aktivnosti u crijevu. Visoki omjer omega-3/omega-6 masnim kiselinama reducira otpuštanje

proinflammatory medijatora u ciklusu arahidonske kiseline, smanjuje agregaciju trombocita i oslobađanje proupalnih citokina IL-1, IL-6 i TNF- α (46).

1.6.3. Kirurško liječenje

Sve potentnijim se lijekovima nastoji odgoditi primjena kirurškog zahvata u bolesnika s Crohnovom bolesti i tako sačuvati što veću apsorpcijsku površinu crijeva. Usprkos tome, u većine će bolesnika biti barem jednom tijekom života indiciran operativni zahvat. Kako su recidivi bolesti na mjestu anastomoza nakon resekcije pravilo inzistira se na minimalnim resekcijama tankog crijeva odnosno strikturoplastici (19). Kod bolesti debelog crijeva savjetuje se također poštena resekcija, odnosno endoskopska dilatacija stenoziiranog segmenta kada je moguće (38). Strikturoplastika u kolonu nije preporučljiva.

PRETPOSTAVKA

Pretpostavka je predložene studije kako u bolesnika s Crohnovom bolesti aktivirani imunološki sustav utječe na metabolizam kostiju potičući diferencijaciju i sazrijevanje osteoklasta. Pretpostavlja se kako lokalna, odnosno sistemna upalna reakcija uz aktiviranje T stanica i lučenje proupalnih citokina, potiče aktivnosti osteoklasta putem RANK/RANKL signalnog puta čime dovodi do pojačane koštane razgradnje. U tu će se svrhu u bolesnika s Crohnovom bolesti ispitati humoralne vrijednosti regulatornih molekula RANK-ligand /osteoprotegerin koje čine dio signalnog puta u sazrijevanju osteoklasta. Analizirat će se njihova povezanost s parametrima upale, biljezima koštane izgradnje i razgradnje, te nalazom koštane gustoće skeleta. Prema dostupnim bibliografskim podacima ovo pitanje još nije istraženo u gastrointestinalnim poremećajima.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći je cilj predložene disertacije evaluirati proširenost koštanih promjena u oboljelih od Crohnove bolesti u smislu razvijanja korisne terapijske strategije. U tu će se svrhu analizirati klinički podaci u kombinaciji s radiološkim metodama i biokemijskim biljezima kako je navedeno u pojedinačnim ciljevima istraživanja.

1. Vrednovati metodu kvantitativnog ultrazvuka (QUS) petne kosti za ocjenu koštanog statusa bolesnika s Crohnovom bolesti, te ju korelirati s parametrima dvostruke apsorpciometrije X-zraka (DXA). Svrha je ispitati koriste li podaci ultrazvuka kao alternativna ili komplementarna opcija nalazu klasične denzitometrije.
2. Analizirati parametre koštanog statusa tehnikama QUS i DXA u ukupnoj populaciji bolesnika s Crohnovom bolesti u poređenju s podacima za kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, kao i zasebno u podskupinama istih bolesnika ovisno o lokalizaciji bolesti, dosad primljenoj terapiji kortikosteroidima i incidenciji koštanih fraktura.

Hipoteza i ciljevi

3. Odrediti humoralne koncentracije RANK-liganda i osteoprotegerina u bolesnika, te ih usporediti s vrijednostima zdravih ispitanika (cross-sectional studija). Ustanoviti moguću povezanost navedenih biokemijskih parametara s koštanom masom prema nalazu denzitometrije, odnosno ultrazvuku petne kosti.
4. U grupi bolesnika ustanoviti moguću povezanost nalaza metaboličke bolesti kosti s:
 - a) razinom proupalnih citokina u serumu: interleukin-6, interleukin-1 β , tumor nekrotizirajući faktor- α i C-reaktivnog proteina
 - b) vrijednostima koštanih biljega u serumu: osteokalcin (koštana izgradnja) i C-telopeptid (koštana razgradnja)
5. Analizirati parametre seruma koji uključuju čimbenike RANKL/OPG, proupalne citokine i koštane biljege u podskupinama bolesnika klasificiranih prema:
 - a) lokalizaciji bolesti
 - b) terapiji kortikosteroidima u trajanju duljem od 3 mjeseca
 - c) indeksu aktivnosti bolesti
 - d) kirurškom liječenju (crijevne resekcije)

Parametri a) - d) će se analizirati kao kategoričke varijable

3.1. BOLESNICI I PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

U istraživanje uključuje 95 bolesnika s dijagnozom Crohnove bolesti bez konkomitantnih bolesti (hipertireoza, hiperparatireoidizam i dr.) koje mogu utjecati na gubitak koštane mase. Dijagnoza Crohnove bolesti postavljena je klinički, radiološki i endoskopski uz histološku potvrdu biopatom sluznice ili reseciranog tkiva. Studija je uključila podjednaki broj muških i ženskih ispitanika, no bolesnici nisu bili diskriminirani obzirom na trajanje, proširenost ili aktivnost bolesti. Ispitivana je populacija obuhvatila bolesnike na hospitalnom i ambulantnom liječenju. U istraživanje nisu bile uključene bolesnice u menopauzi niti bolesnici koji uzimaju neki od preparata (bisfosfonati, kalcitonin, estrogena nadomjesna terapija, SERM) za liječenje osteoporoze.

Podaci koji su pri uključivanju u studiju prikupljeni za svakog bolesnika sadržavali su: dob, spol, tjelesnu težinu i visinu, dijagnozu bolesti, lokalizaciju i trajanje bolesti, aktualnu terapiju, podatke o kirurškom liječenju, podatke za koštane lomove prije i tijekom trajanja bolesti, te za žene podatke o menstrualnom ciklusu. U ovisnosti o terapiji steroidima bolesnici su razvrstani u dvije podskupine: oni koji nikada nisu uzimali navedeni lijek, te bolesnike koji su bili na terapiji prednisonom u minimalnoj dozi od 7.5 mg dnevno dulje od 3 mjeseca.

Pri uključivanju u studiju svakom je bolesniku istovremeno određen koštani status metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti i dvostrukom apsorpciometrijom X-zraka lumbalne kralješnice i kuka. Isti dan kad je određivan koštani status izvađena je krv za rutinske pretrage, koje su uključivale: analizu krvne slike, C-reaktivni protein, fibrinogen, kalcij, fosfor, kreatinin, ureu, alkalnu fosfatazu, AST, ALT, GGT, LDH i elektroforezu serumskih proteina. Krvni serumski za određivanje specifičnih serumskih parametara navedenih u pojedinačnim ciljevima istraživanja pohranjeni su zamrzavanjem. Standardno antropometrijsko mjerenje tjelesne težine i visine koristilo se za izračun indeksa tjelesne mase. Bolesnici su zamoljeni da ispune upitnik koji je uključivao podatke o navikama konzumiranja alkohola, pušenju,

tjelesnoj aktivnosti te podatke o prethodnim koštanim prijelomima i postojanju osteoporoze u obitelji.

U kontrolnu su skupinu izabrani zdravi ispitanici koji prema dobi i spolu odgovaraju ispitivanim bolesnicima. Kontrolnu skupinu za evaluiranje metode kvantitativnog ultrazvuka petne kosti činilo je 200 zdravih dobrovoljaca preuzetih iz studije Kaštelana i sur. (46). Za određivanje referentnih humoralnih vrijednosti parametara koji se odnose na inflamaciju ili mjenu koštanog tkiva u kontrolu je uključeno 30 zdravih ispitanika.

Istraživanje je osmišljeno i provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom iz 2000. godine. Od svih je ispitanika prije uključjenja u studiju zatražen pisani informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra "Zagreb" i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

3.2. METODE ZA MJERENJE KOŠTANOG STATUSA

3.2.1. Metoda dvostruke apsorpcimetrije X-zraka (DXA)

Koštana mineralna gustoća (*engl.* bone mineral density, BMD) mjerena je metodom dvostruke apsorpcimetrije X-zraka aparatom Delphi W (S/N 700483) (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA). Određena je koštana gustoća lumbalnih kralješaka L1-L4 i kosti kuka, a nalazi su izraženi u g/cm^2 . Svako individualno očitavanje instrument automatski uspoređuje s prosječnom gustoćom kosti u zdravoj populaciji i izračunava pripadajuću T-vrijednost, točnije broj standardnih devijacija koji odstupa ispod ili iznad prosjeka za zdravu populaciju. Isti je nalaz za svakog bolesnika bio upoređen s vrijednostima odgovarajuće kontrolne skupine po spolu i dobi te je izražen kao Z-vrijednost.

Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)(48) T-vrijednost je uzeta kao dijagnostički kriterij i nalazi koštanog statusa razvrstani su kako slijedi: *i*) normalni nalaz koštane gustoće označava T-vrijednost veća od -1, *ii*) T-vrijednost između -1 i -2,5 označava osteopeniju, *iii*) dok je nalaz osteoporoze obilježen s T-vrijednošću manjom od -2,5.

3.2.2. Metoda kvantitativnog ultrazvuka (QUS)

QUS je relativno nova metoda za dijagnosticiranje koštanog statusa. Prednost QUS-a u odnosu na klasičnu denzitometriju je u tome što nema ionizirajućeg zračenja, metoda je neinvazivna, aparatura je mobilna i jednostavna za primjenu. Struktura petne kosti lijeve potkoljenice mjerena je aparatom Sahara[®] bone sonometer (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA). Očitavanja su uključivala slijedeće parametre: mineralnu koštanu gustoću (BMD g/cm²) i T-vrijednost, te specifične parametre koji se odnose na energiju BUA (*Broad-beam ultrasound attenuation*) i brzinu SOS (*Speed of sound*) ultrazvučnog vala pri prolazu kroz kost. BUA (dB/MHz) je parametar koji pokazuje slabljenje energije ultrazvučnog vala pri prolasku kroz medij. Pri prolasku kroz petnu kost dolazi do smanjenja energije i rasapa ultrazvučnog signala razmjerno karakteristikama same kosti. Ovaj parametar stoga predstavlja razliku amplituda signalnog vala pri prolasku kroz kalkaneus i referentni medij (gel) a kreće se u rasponu od 0.2-0.6 MHz. Amplituda ultrazvučnog signala (dB) koji je prošao kroz kost upoređuje se sa signalom kroz referentni medijum, a razlika u otklonu se korelira s frekvencijom (MHz). SOS je parametar koji se izražava u metrima na sekundu (m/s). Označava udaljenost (m) prolaska ultrazvučnog vala od odašiljača kroz kost do prijemnika, podijeljenu s utrošenim vremenom (s). Instrument k tome dodatno izračunava indeks ultrazvučnog mjerenja (QUI). QUI je matematički indeks koji predstavlja linearnu kombinaciju parametara BUA i SOS. Kako proizvođač (Hologic, Inc.) nije dao referentne vrijednosti za parametre BUA, SOS i QUI izmjerene instrumentom Sahara, iste smo odredili u skupini zdravih dobrovoljaca (n=228)(46), starosti u rasponu od 21 do 45 godina s medijanom 33,5 god. što je odgovaralo skupini bolesnika uključenih u studiju. Normalne vrijednosti za BUA, SOS, QUI (srednja vrijednost $\pm$ SD), kao i odgovarajuće individualne T-vrijednosti izračunate su prema formuli:

$$T\text{-vrijednost} = (\text{individualno mjerenje} - \text{SD referentne skupine}) / \text{SD referentne skupine} \quad (49).$$

Preciznost mjerenja za parametre BUA i SOS izračunata je po opetovanom mjerenju lijeve petne kosti bez repozicioniranja. U zdravih je dobrovoljaca koeficijent varijacije iznosio 2.7% za BUA i 0.4% za SOS, što je u skladu s

podacima iz literature. U skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva preciznost je bila niža; 17.3% za ponovljeno mjerenje BUA i 9% za SOS. Sva mjerenja za izračunavanje koeficijenta varijacije obavljena su isti dan, pri identičnim uvjetima, a obavio ih je isti operator.

3.3. PARAMETRI SIGNALNOG PUTA RANK, RANK-ligand i OSTEOPROTEGERIN

3.3.1. RANK-ligand

Koncentracija liganda za receptor aktivirajućeg transkripcijskog čimbenika NF κ B (RANKL) u serumu određivana je imunokemijski. Korišten je komercijalno dostupan ELISA test proizvođača Biomedica GmbH, Austrija. Valja napomenuti da je ovom metodom mjerena isključivo koncentracija slobodnog, topivog RANK-liganda, dok kompleks RANKL-OPG nije detektiran. Donji limit detekcije bio je 1.6 pg/ml, a uzorci su mjereni u duplikatu.

3.3.2. Osteoprotegerin

Koncentracija osteoprotegerina u serumu također je određivana imunokemijski, komercijalnim ELISA testom (Biomedica GmbH, Austrija), s tom razlikom da je mjeran ukupni OPG tj slobodni kao i OPG vezan za RANKL. Donji limit detekcije bio je 2.8 pg/ml, a uzorci su mjereni u duplikatu.

Normativne vrijednosti za slobodni sRANKL i OPG određene su u kontrolnoj skupini od 30 zdravih dobrovoljaca, koji su po dobi i spolu odgovarali skupini bolesnika s Crohnovom bolešću. Za sRANKL je izmjerena srednja vrijednost 5.7 (4.7-6.6) pg/ml, a za OPG 52 (44-60) pg/ml uz interval pouzdanosti $\pm 95\%$.

3.4. PROUPALNI CITOKINI: TNF- α , IL-1 β i IL-6

Proupalni citokini koji obilježavaju Crohnovu bolest dio su složene citokinske mreže. Luče se u kaskadi u kojoj se čimbenik tumorske nekroze (TNF- α) generira prvi, slijedi interleukin-1 β , a oba potiču lučenje interleukina-6 koji se pojavljuje s odmakom od par sati. Preljevanje proupalnih citokina u sistemnu cirkulaciju je osobito izraženo pri njihovoj velikoj produkciji. Uzorci seruma za

mjerenje citokina pohranjeni su odmah po vađenju krvi i čuvani na temperaturi od -80 °C. Svi su izrađeni nakon jednokratnog odmrzavanja uporabom komercijalnih ELISA testova velike osjetljivosti proizvođača R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). Korištena je imunoenzimska metoda s donjim limitima detekcije: za TNF- α 0.12 pg/ml, IL-1 β <0.1 pg/ml i 0.039 pg/ml za IL-6. Svi su uzorci mjereni u duplikatu.

3.5. BILJEZI KOŠTANE PREGRADNJE

3.5.1. Osteokalcin

Osteokalcin je nekolageni koštani protein koji proizvode stanice osteoblasta. Nakon sinteze u stanici dio osteokalcina se ugrađuje u koštani matriks, a dio se oslobađa u krvotok te se može mjeriti imunokemijskim metodama. Koristi kao biljeg koštane izgradnje. Za potrebe ovog istraživanja koncentracija osteokalcina u serumu je mjerena testom Immulite® Osteocalcin koji rabi kemoluminiscentni supstrat (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Prema preporuci proizvođača za zdrave se odrasle osobe referentni interval kreće u rasponu 3.1-13.7 ng/ml. Razina osteokalcina može biti povišena u osteoporozi kao posljedica poremećaja u koštanoj pregradnji, a snižena je razina zabilježena pri dugoročnoj terapiji kortikosteroidima.

3.5.2. C-telopeptid

Dobri biokemijski pokazatelji koštane razgradnje su peptidi potekli od kolagena tip I. Molekule kolagena tip I, koji čini glavninu koštanog matriksa, su međusobno križno povezane preko piridina u telopeptidnoj regiji. Kako se kolagen razgrađuje tijekom resorpcije kosti, ovi se umreženi telopeptidi oslobađaju i mogu se detektirati u serumu i/ili urinu kao stabilni C- i N-terminalni fragmenti. Za potrebe ovog istraživanja odlučeno je mjeriti koncentraciju C-telopeptida u serumu. Reproducibilnost mjerenja koštanih biljega je veća u serumu nego li u mokraći, zbog različite ionske jakosti uzoraka urina i potrebe korekcije rezultata prema diurezi. Upotrebljavani su komercijalni testovi koji koriste kompetitivnu ELISA tehniku (Nordic Bioscience Diagnostics A/S,

Denmark). U evaluiranju rezultata ove studije koristili smo referentne vrijednosti koje je dao proizvođač, a odnose se na različite populacije; muškarci: 0.294 ng/ml (0.115-0.748), žene prije menopauze: 0.287 ng/ml (0.112-0.738) i žene u menopauzi: 0.439 ng/ml (0.142-1.351).

3.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U statističkoj obradi podataka koristio se program StatSoft Inc, USA. Rezultati pojedinačnih varijabli prikazani su kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju, odnosno kao medijan (centralna vrijednost) uz raspon vrijednosti. Distribucija varijabli, normalna ili s odstupanjem, ispitana je Kolmogorov-Smirnovjevim testom koji testira značajnost razlika teoretske i empirijske distribucije i prema tome su se u obradi podataka koristili parametrijski (ako je $p > 0.05$) odnosno neparametrijski testovi (ako je $p < 0.05$). Za upoređivanje kliničkih i biokemijskih karakteristika dviju grupa podataka asimetrične distribucije korišteni su Mann Whitney U test odnosno t-test za nezavisne grupe kad je bilo moguće. Uporedno određivanje razlika više nezavisnih grupa pri normalnoj raspodijeli testirano je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) odnosno neparametrijskom inačicom Kruskal-Wallis ANOVA. Podaci za koštanu gustoću mjereni kvantitativnim ultrazvukom i klasičnom denzitometrijom, analizirani su statističkim testovima za zavisne grupe (t-test ili Wilcoxonov test sume rankova). Povezanost dviju varijabli analizirana je linearnom korelacijom (Spearman odnosno parametrijski Pearson test). Multipla parcijalna korelacija ili drugi regresijski modeli upotrijebljeni su u multivarijatnim analizama. Sve varijable koje su pokazale neovisnu i značajnu korelaciju s koštanim statusom u bivarijatnim analizama korelacije dodatno su analizirane modelom multiple regresije. Za sve testove značajnost će se definirati na razini $p < 0.05$.

Kako bi se usporedili rezultati mjerenja koštanog statusa metodama DXA i QUS, bolesnici su razvrstani u dvije skupine. Tako su svi bolesnici s DXA T-vrijednošću < -1.0 klasificirani kao "metabolička bolest kostiju" dok su bolesnici s DXA T-vrijednosti > -1.0 činili skupinu "zdravi skelet". Rezultati izmjereni metodom QUS u odnosu prema dijagnozi temeljem DXA mjerenja izraženi su

2*2 tablicom kontigencije pomoću koje je izračunata valjanost metode kvantitativnog ultrazvuka. Osjetljivost metode izračunata je kao omjer bolesnih osoba koje QUS ispravno prepoznaje kao bolesne (test-pozitivne) od ukupno stvarno bolesnih. Specifičnost metode je omjer osoba zdravog skeleta koje su QUS-om ispravno prepoznate od ukupnog broja stvarno zdravih osoba. Osjetljivost i specifičnost su parametri kojima je izražena valjanost QUS mjerenja. U vezi s dijagnostičkim testom izračunate su pozitivna prediktivna vrijednost, koja predstavlja proporciju stvarno bolesnih među onima koji su pozitivni na testu i negativna prediktivna vrijednost, što je proporcija stvarno zdravih među osobama s negativnim rezultatima.

Preciznost svih mjerenja izražena je pomoću koeficijenta varijacije.

4.1. BOLESNICI S CROHNOVOM BOLESTI

4.1.1. Osnovne kliničke karakteristike

U studiju je uključeno ukupno 95 bolesnika i njihove osnovne kliničke karakteristike prikazane su na tablici 4.

Tablica 4.

<i>Bolesnici</i>	
Crohnova bolest (n) (m/f)	95 (48/47)
Dob (god) (srednja vrijednost, SD)	33±12
Trajanje bolesti (god) (median; raspon)	5.2 (0.1-30)
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	21±4.5
Terapija kortikosteroidima (≥7.5 mg) u trajanju od najmanje 3 mjeseca	
Ne (n)	38
Da (n)	57
Koštana fraktura (n, %)	24 (25%)

Ispitivanu skupinu od 95 bolesnika činilo je njih 80 s dugogodišnjim trajanjem Crohnove bolesti i 15 bolesnika u kojih je bolest tek dijagnosticirana. Novootkiveni su bolesnici bili prosječne dobi od 24±6 godine, u rasponu od 18 do 39 g. i prije uključivanja u studiju nikada nisu primali steroide ili druge imunosupresivne lijekove. Prema inicijalnoj lokalizaciji bolesti u istraživanje je uključen 31 bolesnik (33%) s bolešću samo tankog crijeva, 16 bolesnika (17%) s izoliranom bolešću debelog crijeva i 42 bolesnika (44%) u kojih je bolest zahvatila tanko i debelo crijevo. U šest bolesnika inicijalna ekstenzija bolesti nije definirana zbog nedostatne prve dijagnostičke obrade ili manjka medicinske dokumentacije. Bolesnici s dugogodišnjom Crohnovom bolesti u kojih je indicirana terapija kortikostroidima, inicijalno su bili liječeni visokim dozama (40-60 mg prednisona dnevno) koje su postupno smanjivane na minimum potreban za održavanje remisije prije ukidanja terapije. Kako u ispitivanoj skupini bolesnika niti jedan nije bio na terapiji manjoj od 7.5 mg/dan tijekom 3 mjeseca ta je vrijednost uzeta kao distinktivna vrijednost glede

terapije steroidima. Neposredno, u trenutku određivanja koštanog statusa 76 bolesnika je primalo aminosalicilate, a njih 25 sistemnu steroidnu terapiju. Imunosupresivnu terapiju azatioprinom primalo je 28 bolesnika, a metotreksatom njih dvoje. Šest bolesnika nije imalo nikakve lijekove u terapiji. U manje od polovice operiranih bolesnika, točnije njih devetoro, postoji dokumentacija o dužini reseciranog crijevnog segmenta. Iz navedenog razloga nije bilo moguće analizirati parametre koštanog statusa u ovisnosti o dužini reseciranog segmenta crijeva.

Koštanu je frakturu referiralo 24 bolesnika, no u njih šesnaest (17%) se koštani prijelom dogodio po dijagnozi Crohnove bolesti. Devet je bolesnika imalo frakturu ruke, petoro noge, a u dva je slučaja došlo do napuknuća kralješaka.

4.1.2. Koštani status mjeren DXA metodom

Metodom dvostruke apsorpcimetrije X-zraka određena je mineralna koštana gustoća lumbalnih kralješaka L1-L4 i kuka. Odstupanje individualne T-vrijednosti na jednom ili oba mjerna položaja klasificirano je prema WHO kriterijima kao osteopenija odnosno osteoporoza. Rezultati DXA mjerenja u skupini bolesnika s dugogodišnjom Crohnovom bolesti pokazali su da 75% bolesnika ima smanjenu mineralnu koštanu gustoću, dok je u samo 25% nalaz bio u granicama normalnih vrijednosti za zdravu populaciju. Klasificirano prema BMD T-vrijednosti manjoj od -2.5 čak 26% naših ispitanika ima osteoporozu. Gotovo 50% bolesnika s dugogodišnjom Crohnovom bolesti ima BMD T-vrijednost između -1 i -2.5 bilo na kralješnici ili kuku, što ukazuje na osteopeniju. Terapijom kortikosteroidima liječeno je 57/80 bolesnika u ovoj skupini i njih 44/57 ima smanjenu mineralnu gustoću kostiju.

Posebno je zanimljiv podatak da u skupini s tek dijagnosticiranom Crohnovom bolesti, 53% ispitanika točnije 8/15 ima nalaz osteopenije s BMD T-vrijednosti ≤ -1.0 . Ovo je prva analiza koštanog statusa u naivnih bolesnika s Crohnovom bolesti i do sada neobjavljen podatak u literaturi.

4.2. EVALUACIJA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA

4.2.1. Ligand za receptor aktivirajućeg transkripcijskog čimbenika NFκB (RANKL) i osteoprotegerin (OPG)

Na tablici 5. su prikazane prosječne vrijednosti biokemijskih parametara izmjerenih u serumu, a uključuju slobodni RANK-ligand, osteoprotegerin, proupalne citokine i biljege koštane pregradnje.

Tablica 5.

Koncentracija biokemijskih parametara izmjerenih u skupini od 95 bolesnika s Crohnovom bolesti

<i>Parametar</i>	<i>Bolesnici</i>	<i>Kontrolna skupina</i>	<i>p-value</i>
Osteoprotegerin (pg/ml)	101±37 (8-200)	52±16 (30-82)	p<0.001
RANK-ligand (pg/ml)	10.9±8.2 (0-44)	5.7±1.9 (0-9.6)	p<0.01
Interleukin-6 (pg/ml)	7.6±5.3 (0.6-14.7)	1.8±1 (0.4-9.6)	p<0.001
Faktor nekroze tumora-α (pg/ml)	3.6±1.7 (0.7-8.6)	2.1±2 (0-4.7)	p<0.001
Interleukin-1β (pg/ml)	2.1±3.7 (0-8.4)	0.54± 0.8 (0-2.0)	p<0.01
C-reaktivni protein (mg/l)	28.8±39 (0-255)	<5.0	p<0.001
C-telopeptid (ng/ml)	1.2±1 (0.19-5.19)	0.290±0.195 (0.1-0.750)	p<0.001
Osteokalcin (ng/ml)	9.9±9.4 (1.0-47.4)	8.5±5 (3.1-13.7)	NS

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SD i raspon vrijednosti

Koncentracije RANKL i OPG značajno su povišene u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti u poređenju s vrijednostima izmjerenim u zdravih osoba kontrolne skupine: OPG: 101.6±37 vs 52±16 pg/ml, p=0.001; i slobodni sRANKL: 10.9±8.2 vs 5.7±1.9 pg/ml, p=0.002. U populaciji bolesnika zabilježena je inverzna korelacija između koncentracija RANKL i OPG (r=-0.26; p=0.011). Ovakva korelacija iako slaba, ipak je statistički značajna i nije zabilježena u populaciji zdravih osoba. Bivariatna analiza korelacije pokazala je značajnu ovisnost sRANKL jedino s središnjim medijatorom

upale, TNF- α (Slika 1), dok je OPG pozitivno korelirao s koncentracijama IL-6, CRP i C-telopeptidom. Matrica korelacija prikazana je na tablici 6.

Tablica 6.

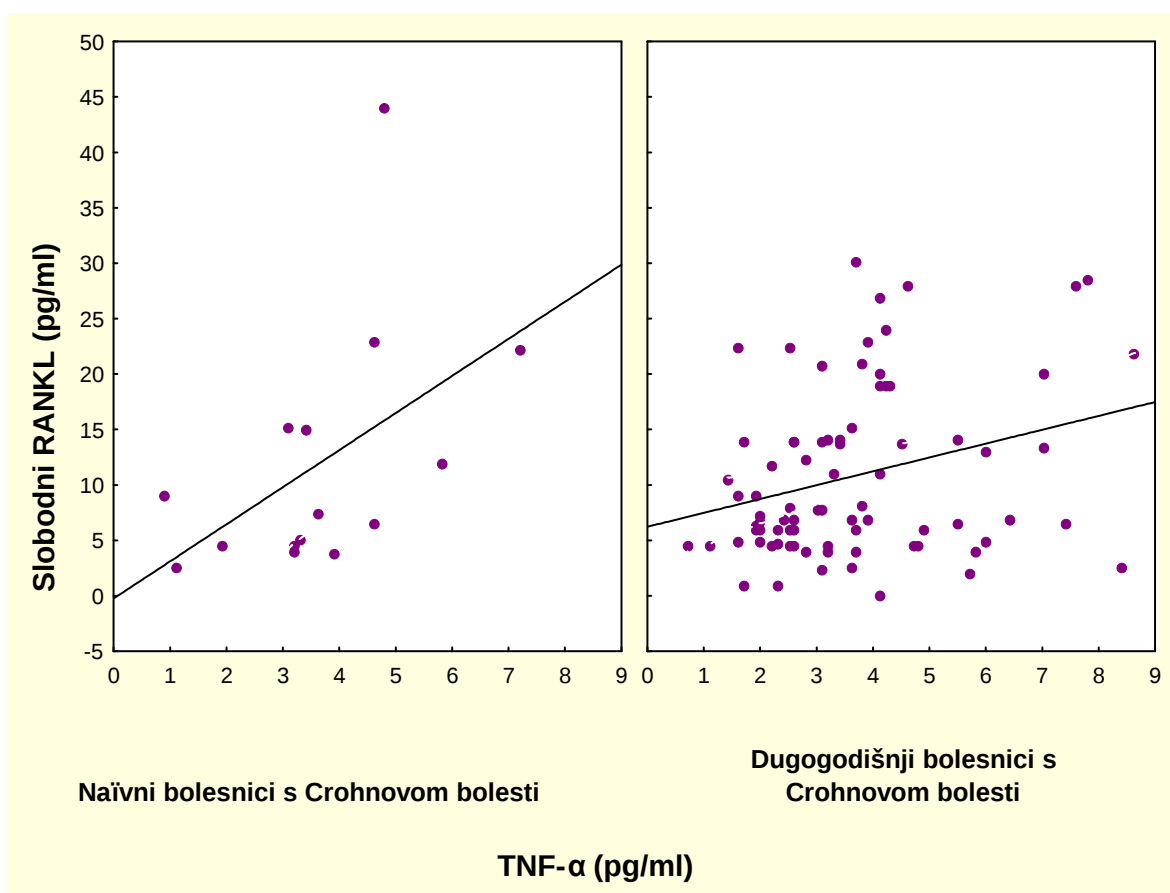
Korelacija kliničkih i biokemijskih parametara s vrijednostima RANKL i OPG u serumu
95 bolesnik s Crohnovom bolesti

	Osteoprotegerin	Slobodni RANKL
Indeks tjelesne mase	R=-0.34; p<0.001	NS
C-reaktivni protein	R=0.54; p<0.001	NS
Interleukin-6	R=0.47 P<0.001	NS
Faktor nekroze tumora- α	NS	R=0.5; p<0.002
C-telopeptid	R=0.49; p<0.002	NS
Osteokalcin	NS	NS
Sedimentacija eritrocita	R=0.38; p<0.001	NS
Eritrociti	R=-0.40; p<0.01	NS
Hemoglobin	R=-0.38; p<0.01	NS
Fibrinogen	R=0.22; p<0.04	NS
Kalcij	R=-0.43; p<0.006	NS
Laktat dehidrogenaza	R=-0.24; p<0.039	R=0.33; p<0.005
Albumin	R=-0.32; p<0.047	NS

4.2.2. Proupalni citokini TNF- α , IL-1 β i IL-6

Proupalni citokini TNF- α , IL-1 β i IL-6 su dio složene signalne mreže citokina. U toj se kaskadi TNF- α generira prvi, slijedi IL-1 β a potom oba citokina potiču sintezu i lučenje IL-6 kao posljednjeg u nizu. Preljevanje citokina u sistemnu cirkulaciju je osobito izraženo pri njihovom prevelikom lokalnom lučenju. U svih bolesnika ispitivanih za potrebe ove studije izmjerena je, u perifernoj cirkulaciji, viša koncentracija proupalnih citokina nego li u zdravih osoba kontrolne skupine (Tablica 5). Interleukin-6 i TNF- α detektirani su u serumima svih ispitanika, dok IL-1 β nije bilo moguće izmjeriti u 30% slučajeva.

U nastavku studije je analiziran odnos i povezanost u biogenezi proupalnih citokina s parametarima signalnog puta RANKL/RANK/OPG. Analiza multiple regresije pokazala je značajanu povezanost TNF- α sa sRANKLom ($p < 0.001$), točnije da je središnji medijator upale, TNF- α , najbolji prediktivni parametar za generiranje RANKLa (Slika 1). S druge pak strane na produkciju OPG podjednako značajno utječu IL-6 ($p = 0.001$) kao i sam RANKL ($p = 0.008$).



Slika 1.

Pozitivna i statistički značajna korelacija između serumskih koncentracija središnjeg proupalnog citokina TNF- α i posrednika u osteoklastogenezi sRANK-liganda zabilježena u skupini naivnih bolesnika s Crohnovom bolesti ($n = 15$) ($r = 0.6$; $p = 0.027$), a ta je pozitivna korelacija održana i u populaciji bolesnika s dugogodišnjim trajanjem Crohnove bolesti ($n = 80$) ($r = 0.3$; $p = 0.009$).

4.2.3. Biljezi koštane pregradnje

Koncentracije osteokalcina i C-telopeptida u plazmi, korištene su kao pokazatelji aktivnosti koštanog metabolizma. Osteokalcin je parametar koštane izgradnje dok je C-telopeptid razgradni produkt umreženog kolagena tip I i kao takav je produkt koštane razgradnje. Razina osteokalcina u serumu ispitivanih bolesnika s Crohnovom bolesti kretala se u rasponu od 1.0 do 47.4 ng/ml, što je bitno različito od referentnog raspona za zdrave odrasle osobe koji iznosi od 3.1-13.7 ng/ml kako je prikazano na tablici 5. Snižena razina osteokalcina u koncentraciji manjoj od 3 ng/ml je izmjerena u serumu 21-nog bolesnika, od kojih je 81% bilo na terapiji kortikosteroidima. Povišena razina osteokalcina (16.2 ± 14 vs 8.5 ± 6 ng/ml; $p=0.028$) zabilježena je u novodijagnosticiranih bolesnika s reduciranom mineralnom gustoćom kosti (T-vrijednost ≤ -1).

U perifernoj cirkulaciji oboljelih od Crohnove bolesti izmjerena je povišena koncentracija C-telopeptida u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini zdravih osoba (1.15 ± 1.08 vs 0.290 ± 0.195 ng/ml; $p=0.001$). Štoviše, u 52% slučajeva, koncentracija C-telopeptida je prelazila gornji limit normalne vrijednosti od 0.750 ng/ml ustanovljen za zdrave muške osobe i žene prije menopauze (Tablica 5.). Povišena razina parametra koštane resorpcije zabilježena je podjednako u muških i ženskih ispitanika. U skupini bolesnika koju čine ispitanici s razinom C-telopeptida ≥ 0.750 ng/ml izmjerena je i značajno viša koncentracija proupalnih citokina u poređenju s bolesnicima u kojih je koštana razgradnja bila nižeg intenziteta: OPG (110 ± 42 vs 92 ± 30 ng/ml; $p=0.019$), interleukin-6 (9.0 ± 5 vs 6.0 ± 5 pg/ml; $p=0.009$), TNF- α (4 ± 1.2 vs 3.3 ± 1.5 pg/ml; $p=0.04$) i CRP (37.7 ± 44 vs 19 ± 32 pg/ml; $p=0.024$), dok je u istih indeks tjelesne mase bio snižen (19.7 ± 3 vs 22.6 ± 5 ; $p=0.005$).

4.3. KORELACIJA KOŠTANOG STATUSA I BIOKEMIJSKIH PARAMETARA

Prema mineralnoj koštanoj gustoći bolesnici s Crohnovom bolesti podijeljeni su u tri podskupine: (i) skupina s zdravim skeletom, (ii) skupina s osteopenijom i (iii) bolesnici s osteoporozom. Analizom varijance - ANOVA - utvrdili smo značajnu razliku u koncentracijama biokemijskih parametara unutar tri promatrane podskupine. Crohnovi bolesnici s utvrđenom metaboličkom bolesti kostiju imali su više

Rezultati

koncentracije osteoklastičnog posrednika RANKL i njegovog receptora OPG, kao i visoke koncentracije proupalnih citokina, kako je prikazano na tablici 7. Aktivnost proupalnih citokina IL-6 i TNF- α značajno je povišena u skupinama sa smanjenom mineralnom gustoćom kostiju (IL-6 $p=0.01$; TNF- α $p=0.025$), s time da je najviša koncentracija izmjerena u bolesnika s osteoporozom (Tablica 7).

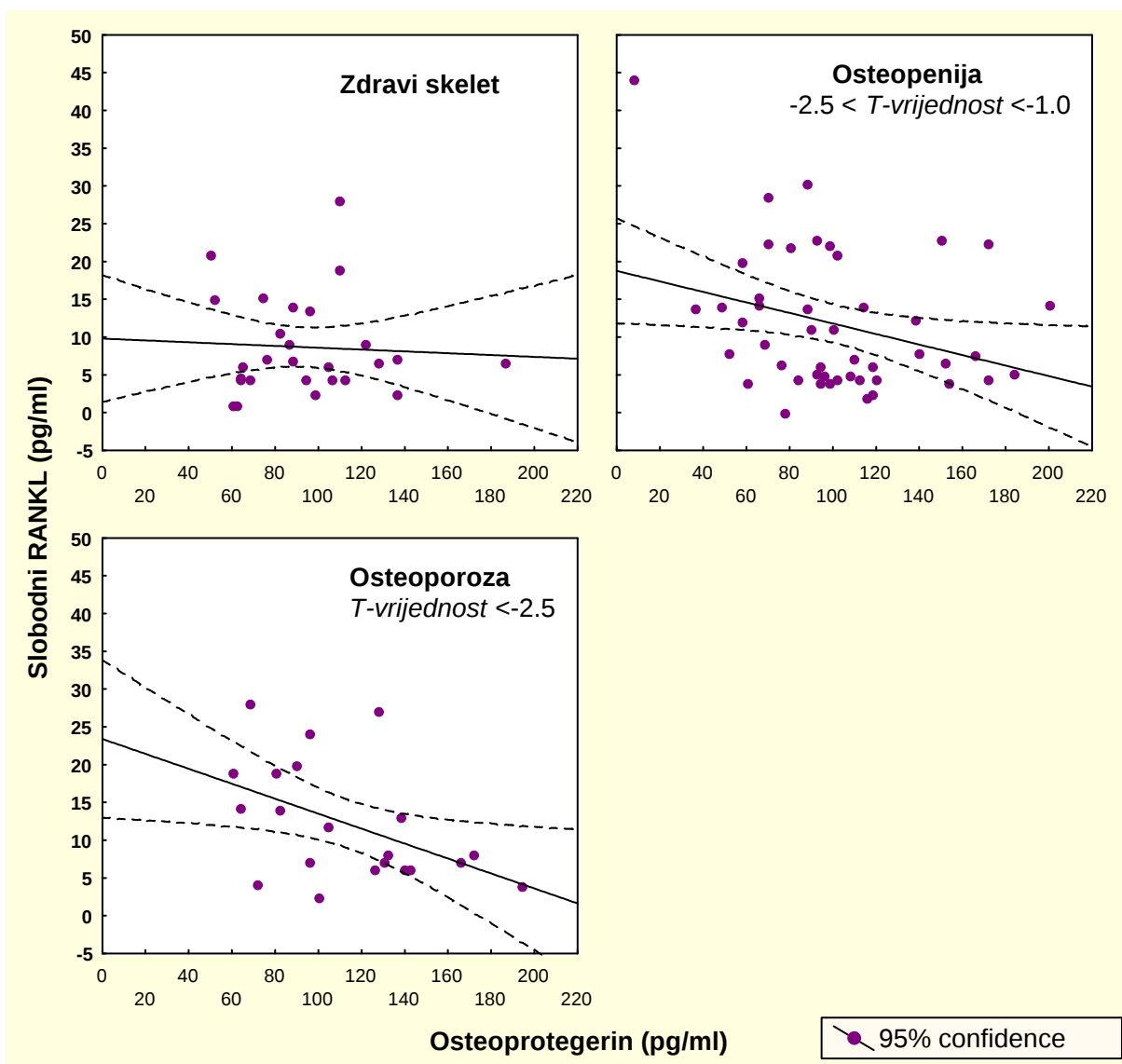
Analiza korelacije RANKL-a i OPG u tri podskupine s normalnom i smanjenom mineralnom koštanom gustoćom, pokazala je nedostatak korelacije u bolesnika s zdravim skeletom, dok je u skupinama bolesnika s metaboličkom bolesti kosti zabilježena statistički značajna, ali inverzna korelacija. U bolesnika s BMD T-vrijednosti između -1.0 i -2.5 koeficijent korelacije i statistička značajnost iznosili su: $r=-0.31$; $p=0.033$, dok je u bolesnika s osteoporozom (BMD T-vrijednost ≤ -2.5) ta je korelacija bila još značajnija $r=-0.48$; $p=0.028$ (Slika 2).

Tablica 7.

Biokemijski parametri u bolesnika s Crohnovom bolesti sa i bez metaboličke bolesti kosti

Parametar	Mineralna gustoća kosti mjerena DXA metodom		
	T-vrijednost >-1.0	-2.5<T-vrijednost $\leq$ - 1.0	T-vrijednost $\leq$ -2.5
Bolesnici s Crohnovom bolesti (n=81)	28%	50%	22%
Trajanje bolesti (god)	5.7 $\pm$ 6	7 $\pm$ 6	8.4 $\pm$ 6.6
Osteoprotegerin (pg/ml)	93 $\pm$ 30	101 $\pm$ 40	113 $\pm$ 37*
Slobodni RANKL(pg/ml)	8.7 $\pm$ 6	11.7 $\pm$ 9	12.2 $\pm$ 7*
Interleukin-6 (pg/ml)	5.9 $\pm$ 5	7.3 $\pm$ 5	10.5 $\pm$ 5**
Faktor nekroze tumora- α (pg/ml)	2.9 $\pm$ 1.6	3.8 $\pm$ 1.8	3.95 $\pm$ 1.4*
C-telopeptid (ng/ml)	1.1 $\pm$ 1	1.3 $\pm$ 1	0.9 $\pm$ 1
Osteokalcin (ng/ml)	7.6 $\pm$ 5	11.7 $\pm$ 11	8.5 $\pm$ 5

DXA, Metoda dvostruke apsorpcimetrije X-zraka
ANOVA: * $p<0.05$ i ** $p<0.01$



Slika 2.

Koštani status i korelacija između osteoklastičnog posrednika RANKL i njegovog dekodirajućeg receptora OPG u perifernoj krvi bolesnika s Crohnovom bolesti. Analiza korelacije RANKL-a i OPG u tri podskupine s normalnom i sniženom mineralnom koštanom gustoćom, pokazala je nedostatak korelacije u bolesnika s zdravim skeletom, dok je u skupinama bolesnika s metaboličkom bolesti kosti zabilježena statistički značajna, ali inverzna korelacija. U bolesnika s BMD T-vrijednosti između -1.0 i -2.5 koeficijent korelacije i statistička značajnost iznosili su: $r=-0.31$; $p=0.033$, dok je u bolesnika s osteoporozom (BMD T-vrijednost ≤ -2.5) ta je korelacija bila još značajnija $r=-0.48$; $p=0.028$.

Korištenjem analize multiple parcijalne korelacije analizirana je međusobna korelacija kliničkih i biokemijskih varijabli prema mineralnoj gustoći kosti lumbalne kralješnice i kuka kako je prikazano na tablici 8. Nađena je statistički značajna, ali inverzna međuovisnost između citokina IL-6 i TNF- α , te koštane gustoće lumbalne kralješnice i kuka, iako se mora reći kako ta korelacija nije odviše snažna. Modelom multiple regresije korak-po-korak evaluiran je odnos između mineralne koštane gustoće i metaboličkih parametara: OPG, sRANKL, IL-6, TNF- α , C-telopeptida, osteokalcina i Ca. Ova je analiza pokazala da je koncentracija IL-6 najbolji prediktivni parametar mineralne gustoće kosti lumbalne kralješnice ($\beta = -0.32$; $p < 0.034$). Kada su isti metabolički parametri uzeti u analizu, multivarijatnim regresijskim modelom su identificirani TNF- α ($\beta = -0.31$) i OPG ($\beta = -0.28$) kao najznačajniji nezavisni čimbenici koji vrlo značajno, ali negativno utječu na mineralnu gustoću kosti kuka ($p < 0.005$).

Što se tiče biokemijskih biljega koštane pregradnje, nije zabilježena nikakva korelacija između serumskih koncentracija osteokalcina i C-telopeptida s jedne strane te mineralne gustoće kosti lumbalne kralješnice ili kuka s druge strane. Jedino je zapažena pozitivna korelacija između C-telopeptida i osteokalcina ($r = 0.38$; $p = 0.04$) u ispitanika s normalnom koštanom masom i balansiranom koštanom homeostazom, ali takva korelacija nije više opstala u skupinama bolesnika s osteopenijom ili osteoporozom.

Tablica 8.

Analiza multiple regresije kliničkih i biokemijskih parametara *versus* mineralna gustoća kosti lumbalne kralješnice i kuka

	BMD: kralješci L1-L4	BMD: kuk
Trajanje Crohnove bolesti	NS	R=-0.32; p<0.004
Indeks tjelesne mase	R=0.28; p<0.01	R=0.26; p<0.022
Osteoprotegerin	NS	NS
Slobodni RANKL	NS	NS
C-reaktivni protein	NS	NS
Interleukin-6	R=-0.22; p<0.045	R=-0.23; p<0.041
Faktor nekroze tumora- α	R=-0.28; p<0.01	R=-0.28; p<0.012
Interleukin-1 β	NS	NS
C-telopeptid	NS	NS
Osteokalcin	NS	NS
Kalcij	NS	R=0.32; p<0.008
Fosfor	NS	NS
Alkalna fosfataza	R=-0.25; p<0.036	NS
Albumin	R=0.32; p<0.01	R=0.36; p<0.003
BMD, mineralna gustoća kosti		

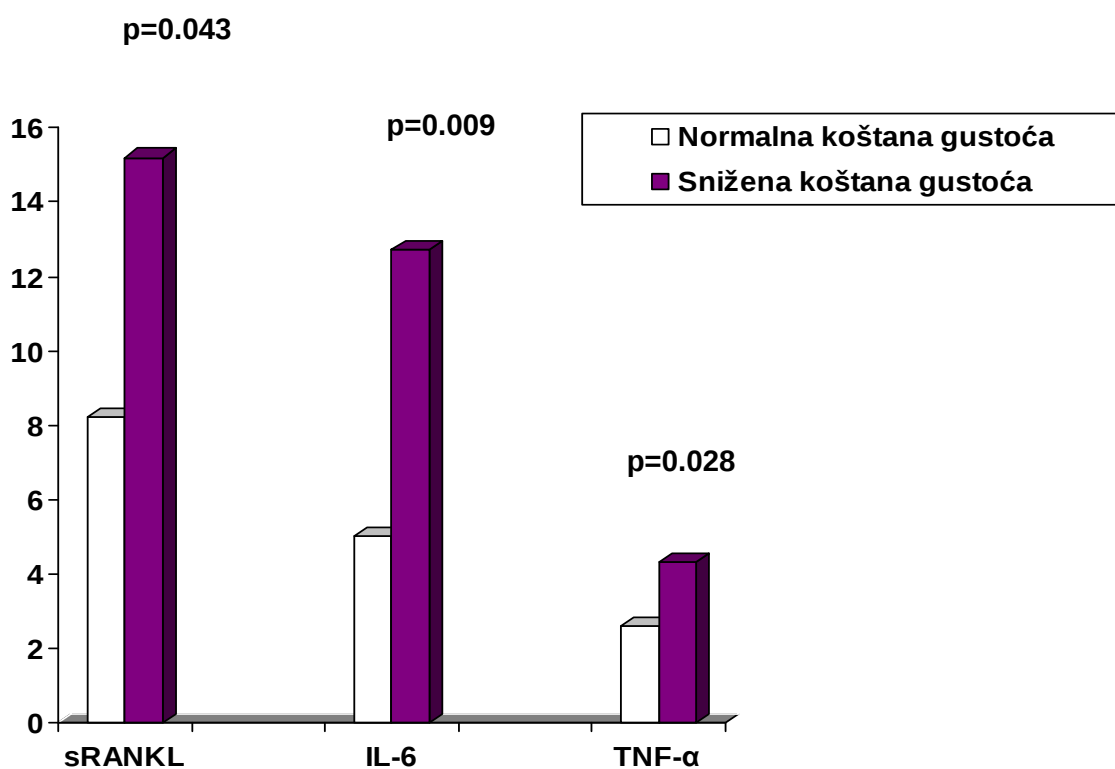
4.4. KOŠTANI STATUS U NAIVNIH BOLESNIKA S CROHNOVOM BOLESTI

U skupinu ispitanika s Crohnovom bolesti je osim bolesnika s dugogodišnjim trajanjem bolesti uključeno i 15 bolesnika u kojih je bolest neposredno dijagnosticirana, a do uključivanja u studiju nisu primali nikakvu terapiju za liječenje Crohnove bolesti. Tu su podskupinu činile mlađe adultne osobe, prosječne starosti 24 ± 6 godina (18-39). U 53% naivnih bolesnika (8/15) već je pri dijagnozi utvrđena reducirana mineralna gustoća kosti lumbalne kralješnice i/ili kuka; s prosječnom T-vrijednosti od -1.19 ± 0.7 izmjereno za lumbalnu kralješnicu i -0.82 ± 0.6 za kosti kuka. Od ovih je bolesnika njih petero imalo BMD T-vrijednost ≤ -1.0 za kralješnicu; u dvoje je izmjerena T-vrijednost ≤ -1.0 na kuku, dok je u jednog 25-godišnjeg mladića zabilježena BMD T-vrijednost ≤ -1.9 i za kralješnicu i za kuk.

U podskupini naivnih bolesnika sa sniženom mineralnom gustoćom kosti zabilježen je niži indeks tjelesne mase (21 ± 5 vs 16 ± 3 ; $p=0.025$), značajnije povišena koncentracija proupalnih citokina u serumu (Slika 3), viši CRP (39.8 ± 30 vs 21.7 ± 25), i pojačane aktivnosti sRANKL (15.8 ± 7 vs 9.3 ± 6 ; $p=0.033$) i OPG (111 ± 60 vs 96 ± 23 ; $p=0.004$) nego li u naivnih bolesnika zdravog skeleta. U skupini naivnih bolesnika također je nađeno da koncentracije centralnog proupalnog citokina TNF- α u serumu izrazito negativno, ali vrlo značajno koreliraju s koštanom mineralnom gustoćom mjerenom na kralješnici ($r=-0.6$, $p=0.023$) i kuku ($r=-0.63$, $p=0.015$) (Slika 4). U skupini novodijagnosticiranih bolesnika s Crohnovom bolesti nađena je izvrsna korelacija između proupalnog medijatora TNF- α i osteoklastičnog posrednika sRANKL ($r=0.6$; $p=0.027$) (Slika 1). Slobodni RANKL, izmjeran u perifernoj krvi naivnih bolesnika sa smanjenom koštanom gustoćom, vrlo dobro je korelirao sa svojim dekodirajućim receptorom OPG i ta je korelacija inverzna ($r=-0.85$; $p=0.02$). Međutim u podskupini naivnih bolesnika zdravog skeleta (T-vrijednost > -1 SD) nema povezanosti između sRANKL i OPG.

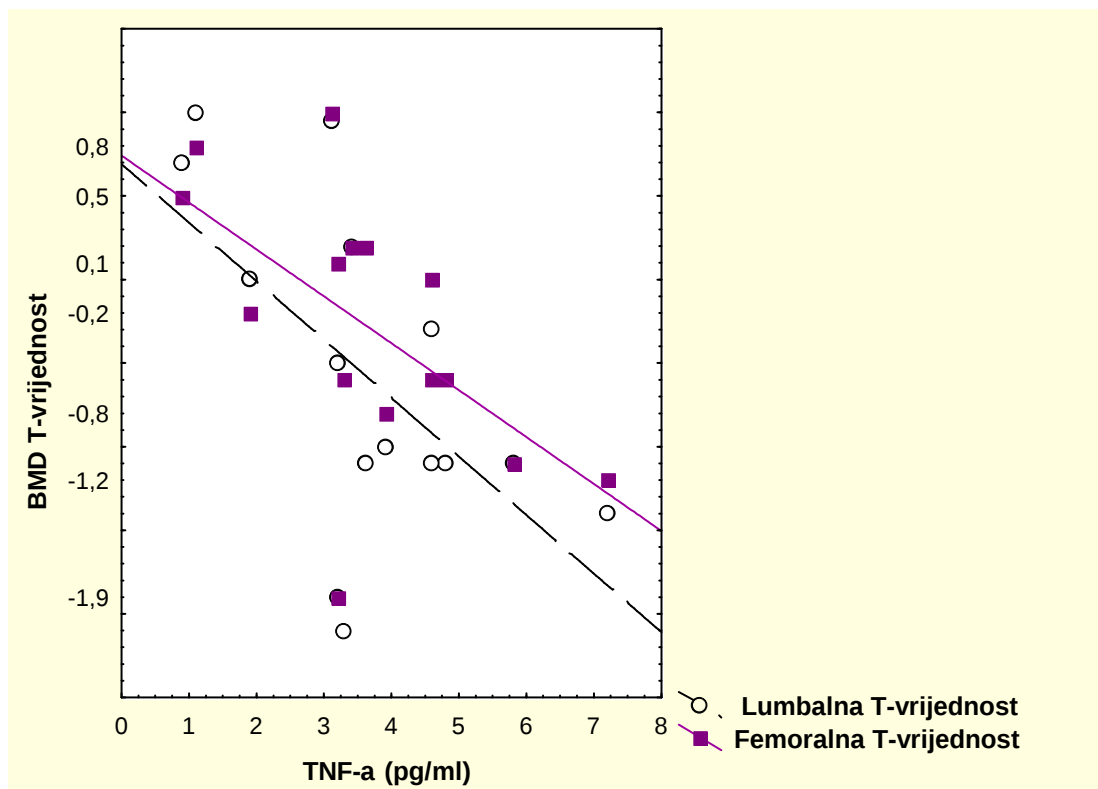
U serumima naivnih bolesnika izmjerena je povišena razina biokemijskog markera koštane resorpcije C-telopeptida, u odnosu na razinu istog parametra u zdravih osoba kontrolne skupine koja je po dobi i spolu odgovarala novodijagnosticiranim bolesnicima s Crohnovom bolesti. Štoviše, srednja vrijednost izmjerena u naivnih bolesnika od 1.08 (ng/ml) (interval pouzdanosti 0.85-1.31) značajno prelazi gornji

limit normalne vrijednosti od 0.750 ng/ml ustanovljen za zdrave muške osobe i žene prije menopauze (Tablica 5). U istim je uzorcima razina osteokalcina bila unutar referentnog intervala.



Slika 3.

Aktivnost proupalnih citokina TNF- α i IL-6 i razina osteoklastičnog posrednika RANKL izmjerenih u serumima naivnih bolesnika s Chronovom bolesti (n=15). Bolesnici u kojih je utvrđena snižena mineralna gustoća kosti lumbalne kralješnice i/ili kuka (n=8) imali su značajno višu koncentraciju TNF- α (p=0.028) i IL-6 (p=0.009), povišen CRP, te pojačanu produkciju slobodnog RANKL (p=0.043) i njegovog receptora osteoprotegerina (p=0.004).



Slika 4.

U skupini naivnih bolesnika s Crohnovom bolesti mineralna gustoća kosti lumbalne kralješnice (L1-L4) i kuka (BMD T-vrijednost) korelirala je izrazito negativno s razinom humoralnog TNF- α ; koeficijent korelacije i statistička značajnost za kralješnicu iznosili su $r=-0.6$; $p=0.02$, a slične su vrijednosti i za kosti kuka $r=-0.63$, $p=0.012$.

4.5. TERAPIJA KORTIKOSTEROIDIMA I KOŠTANI STATUS

Od 95 Crohnovih bolesnika uključenih u studiju, 57 ih je tijekom bolesti liječeno kortikosteroidima kako je to opisano u sekciji 4.1. Bolesnici liječeni kortikosteroidima ≥ 7.5 mg prednisone/dnevno u razdoblju duljem od 3 mjeseca, imali su značajno reduciranu mineralnu gustoću kosti lumbalne kralješnice (-1.7 ± 1.6 vs -0.89 ± 1 ; $p=0.011$) i kuka (-1.3 ± 1 vs -0.66 ± 0.9 ; $p=0.005$), što je dodatno potvrđeno mjerenjem kvantitativnog ultrazvuka petne kosti čiji je QUS indeks iznosio: 88.6 ± 19.2 vs 78.7 ± 17 ; $p=0.015$.

Između podskupina bolesnika koji su dugotrajno liječeni kortikosteroidima i bolesnika koji nisu primalu tu terapiju nije zabilježena značajna razlika u vrijednostima osteoklastičnih posrednika, proupalnih citokina i C-telopeptida u serumu. No, značajno reducirana razina osteokalcina, izmjerena je u bolesnika na terapiji kortikosteroidima. Osteokalcin u koncentraciji manjoj od 3 ng/ml izmjerena je serumu 21-nog bolesnika, od kojih je 81% bilo na terapiji kortikosteroidima.

4.6. FRAKTURE

Koštanu je frakturu u povijestima bolesti navelo 25% ispitivanih bolesnika. Međutim, za potrebe ove studije zanimale su nas samo frakture koje su se zbile poslije dijagnoze Crohnove bolesti i to frakture koje nisu uzrokovane traumom. Prema tom kriteriju incidencija fraktura nakon postavljanja dijagnoze iznosi 17% (16/95). Između bolesnika sa i bez koštanih prijeloma tijekom trajanja bolesti nije zabilježena razlika u mineralnoj gustoći kosti lumbalne kralješnice, dok je BMD T-vrijednost izmjerena na kuku bila nešto specifičnija (-1.4 ± 1.1 vs -0.77 ± 1 ; $p=0.007$). Za razliku od DXA mjerenja, parametri kvantitativnog ultrazvuka petne kosti BUA i SOS, identificirali su bolesnike s visokim rizikom koštanog loma o čemu će biti više riječi u slijedećem poglavlju.

Bolesnici s jednim ili više koštanih prijeloma imali su značajno dulje trajanje bolesti (9.3 ± 6 vs 6.5 ± 6 god), a 70% ih je dugotrajno liječeno kortikosteroidima. Što se tiče biokemijskih parametara, nije nađena značajnija razlika u bolesnika s i bez koštanih prijeloma.

4.7. VREDNOVANJE METODA DXA I QUS PRI ODREĐIVANJU KOŠTANOG STATUSA

4.7.1. Mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS)

Učestalost razvijanja metaboličke bolesti kosti ne samo u bolesnika s Crohnovom bolesti, nego općenito u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva, zahtjeva češća mjerenja koštanog statusa, i to ne samo jednokratno, već opetovano vezano uz terapiju i trajanje bolesti. U tu se svrhu, kao alternativna pretraga, vrednovala metoda kvantitativnog ultrazvuka petne kosti. QUS je relativno nova metoda čija se prednost u odnosu na klasičnu denzitometriju ogleda u tome što nema ionizirajućeg zračenja, metoda je neinvazivna, a aparatura mobilna i jednostavna za primjenu. Za potrebe ove studije mjereni su parametri kvantitativnog ultrazvuka petne kosti: BUA, SOS i QUI te su ustanovljene odgovarajuće T-vrijednosti u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva koju je činilo 95 bolesnika s Crohnovom bolesti i 31 bolesnik s dijagnozom ulceroznog kolitisa. Međutim, kako od strane proizvođača nisu prezentirane referentne vrijednosti za QUS parametre, iste smo odredili u skupini zdravih dobrovoljaca ($n=228$), starosti u rasponu od 21 do 45 godina s medijanom 33,5 god. što je odgovaralo skupini bolesnika uključenih u studiju. Normalne vrijednosti za BUA, SOS, QUI (srednja vrijednost $\pm$ SD), kao i odgovarajuće individualne T-vrijednosti prikazane su na tablici 9.

Sva su tri QUS parametra značajno snižena u populaciji bolesnika nego li u zdravih dobrovoljaca kontrolne skupine (BUA $p<0.001$; SOS $p<0.001$; QUI $p<0.001$). Analizom varijance ANOVA, nije utvrđena razlika u navedenim QUS varijablama između bolesnika s Crohnovom bolesti i bolesnika s ulceroznim kolitisom. U skupinama istih bolesnika, također nije bilo razlike u vrijednostima DXA mjerenja niti za kralješnicu ($p=0.68$) niti za kuk ($p=0.061$). Modelom multiple regresije analizirani su utjecaji dobi, trajanje bolesti i indeksa tjelesne mase na QUS varijable i pokazalo se da je jedino trajanje bolesti od prediktivnog značenja ($p<0.01$). Naime, svi su QUS parametri negativno korelirali s vremenom trajanja bolesti ($r=-0.3$, $p=0.002$) (Slika 5). Od ukupnog 126 bolesnika s upalnim bolestima crijeva njih je 23% navelo jednu ili više koštanih fraktura u povijesti bolesti. Kada smo usporedili nalaze kvantitativnog

Rezultati

ultrazvuka u bolesnika koji su imali koštanih prijeloma (n=28) i ostatka skupine koji nisu navodili frakture (n=98) zapaženo je da su QUS T-vrijednosti statistički značajno niže u ispitanika s koštanim prijelomima (T-vrijednost: BUA -2.0 vs. -1.3, p=0.008; SOS -2.1 vs. -1.4, p=0.02; QUI -2.3 vs. -1.5, p=0.009) (Slika 6). Za iste smo skupine ispitanika usporedili i rezultate mjerenja klasičnom denzitometrijom. Dok se DXA mjerenja kralješnice nisu razlikovala (-1.7 vs. -1.2, p=0.1), rezultati koštane gustoće izmjerene na kuku bili su značajno niži u osoba s koštanim prijelomima (-1.6 vs. -0.7, p=0.001).

Tablica 9.

Vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva i referentne vrijednosti u zdravih dobrovoljaca kontrolne skupine

	<i>Bolesnici</i>	<i>Referentne vrijednosti</i>	<i>p-vrijednosti</i>
n	126	228	
Dob (god)	34.9±12	32.5 ± 8	NS
BUA (dB/MHz)	66.7±16	88.7±13.8	0.00041
BUA T-vrijednost	-1.4±1.1		
SOS (m/s)	1529.7 ±31	1570±25	0.000001
SOS T-vrijednost	-1.7±1.2		
QUI- index	83.61±18	108.5±14.5	0.000001
QUI T-vrijednost	-1.69±1.2		

BUA, promjena energije ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost

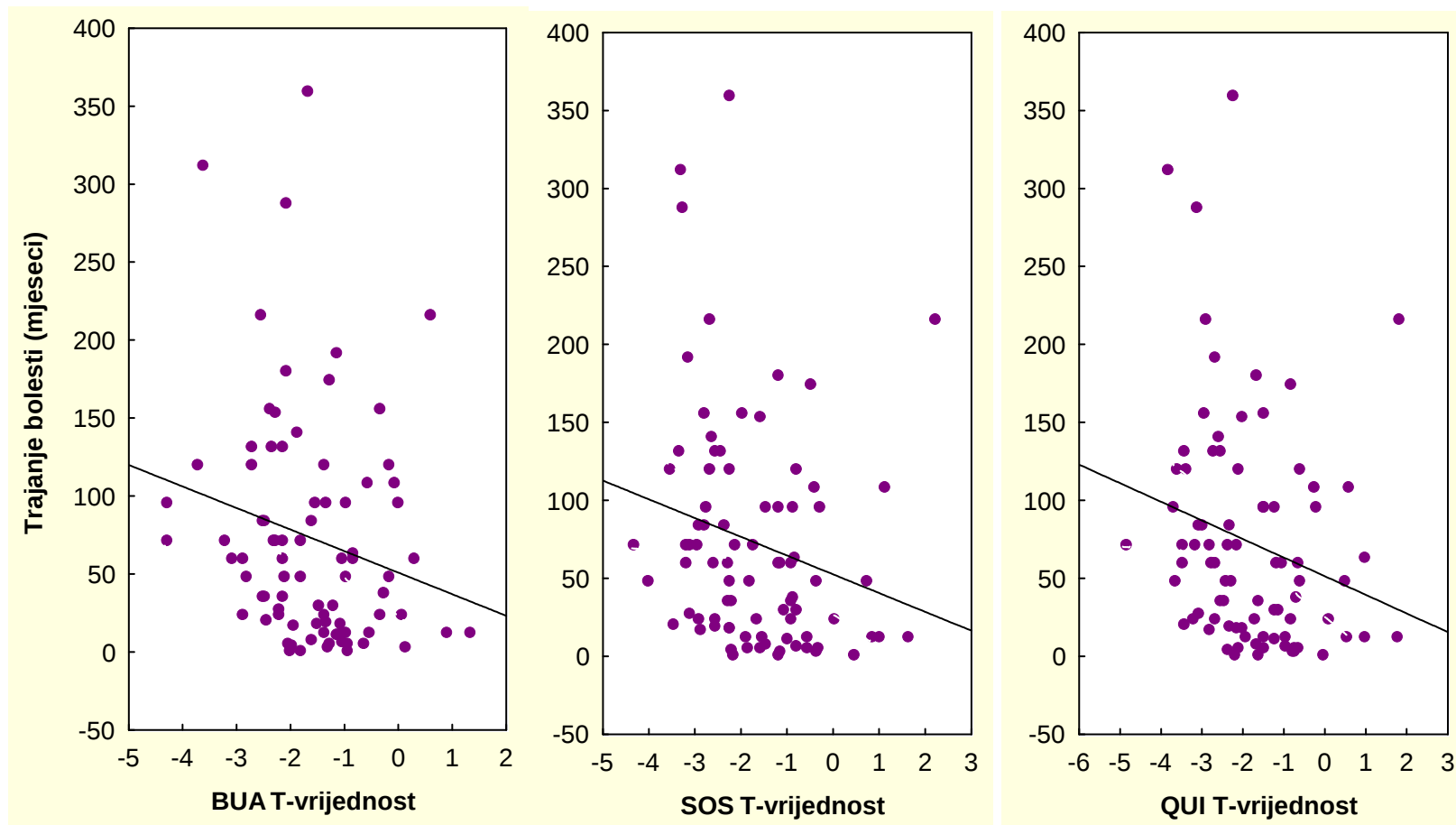
SOS, brzina prolaza ultrazvučnog vala

QUI, indeks kvantitativnog ultrazvuka

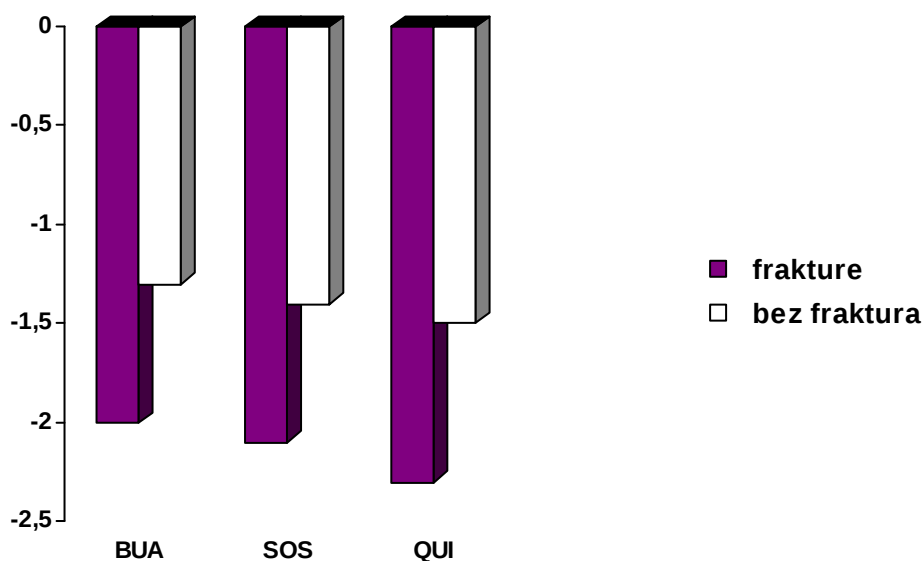
T-vrijednost, broj standardnih devijacija koji odstupa ispod ili iznad prosjeka za zdravu populaciju

Svi su parametri izraženi kao srednja vrijednost±SD

Rezultati



Slika 5. Korelacija između parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti i trajanja bolesti za 126 bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Statistički značajna ali negativna korelacija zabilježena je za sve tri promatrane varijable: BUA ($r=-0.3$; $p=0.002$), SOS ($r=-0.35$; $p=0.001$) i QUI ($r=-0.33$ $p=0.001$).



Slika 6.

T-vrijednosti za varijable kvantitativnog ultrazvuka petne kosti; BUA, SOS i QUI, u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji bilježe koštane frakture (n=28) u odnosu na bolesnike koji nisu imali koštanih lomova (n=98). Prosječne QUS T-vrijednosti svih triju varijabli statistički su značajno negativnije u skupini koju čine bolesnici s jednim ili više koštanih prijeloma; BUA T-vrijednost $p=0.008$; SOS T-vrijednost $p=0.02$; QUI T-vrijednost $p=0.001$.

4.7.2. Usporedba rezultata koštanog statusa DXA *versus* QUS

Mineralna gustoća kosti, odnosno pripadajuće T-vrijednosti mjerene metodom klasične denzitometrije, uzete su po preporuci Svjetske zdravstvene organizacije kao relevantni nalaz koštanog statusa i bolesnici su razvrstani u podskupine kako slijedi:

- i) normalni nalaz koštane gustoće označava T-vrijednost veća od -1.0 što je imalo 41% bolesnika,
- ii) nalaz osteopenije karakteriziran vrijednostima BMD $-2.5 < T\text{-vrijednost} \leq -1.0$ nađen je u 39% bolesnika,
- iii) dok je osteoporozi obilježenu s T-vrijednosti manjom od -2.5 imalo 20% bolesnika

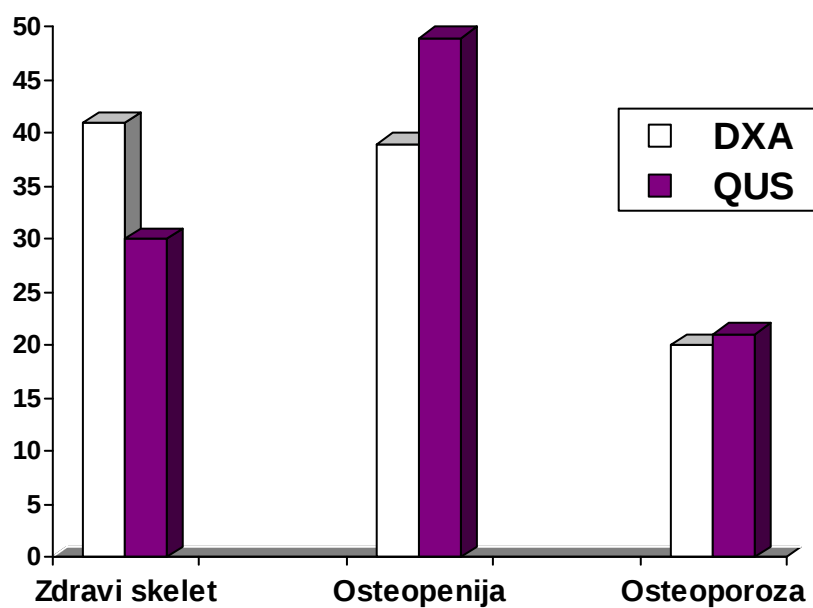
U istih je bolesnika mjerenjem T-vrijednosti za indeks QUS identificirao 30% bolesnika s normalnim koštanim statusom, dok je osteopenija detektirana u 49%, a osteoporoza u 21% ispitanika, kako je grafički prikazano na slici 7.

Osteoporoza dijagnosticirana klasičnom denzitometrijom potvrđena je pomoću QUS parametara u 13/18 slučajeva, dok je u 5/18 slučajeva pogrešno identificirana kao osteopenija. Mora se naglasiti kako QUS niti jedan slučaj DXA osteoporoze nije lažno identificirao kao normalan nalaz.

Međutim, ispitivanje osjetljivosti i specifičnosti QUS metode pokazalo je mnogo veće razlike u rezultatima dviju tehnika. Naime svi bolesnici u kojih je DXA mjerenjem utvrđena T-vrijednost <-1.0 klasificirani su kao "metabolička bolest kostiju". Potom je izračunato s kolikom će osjetljivošću indeks QUS-a prepoznati bolesnike te skupine. Osjetljivost QUS indeksa da detektira metaboličku bolest kostiju iznosila je dobrih 93%, no specifičnost metode od 63% je nedovoljna da se DXA jednostavno zamjeni kvantitativnim ultrazvukom. Izračunata pozitivna prediktivna vrijednost QUS-a je 78%, dok je negativna prediktivna vrijednost 86%. Osjetljivost QUS metode da detektira osteopeniju je 84%, a za osteoporozu samo 72%. U skladu s time i Kappa statistika je pokazala samo umjerenu podudarnost dvaju tehnika ($\kappa=0,58$ $SE_{(\kappa)}=0,15$ $z=3,9$).

Učinjeni su dodatni pokušaji kako bi se rezultate kvantitativnog ultrazvuka učinilo uporabljivim u svakodnevnoj rutinskoj praksi. Tako je prema preporuci Frost i sur. (50) revidiran kriterij za klasifikaciju i izabrana je manje negativna prijelomna T-vrijednost za QUI koja iznosi ≤ -1.8 što je nešto blaže od granice za osteoporozu prema DXA mjerenju koja iznosi manje od -2.5 . Sa QUI T-vrijednosti ≤ -1.8 identificirano je 83% slučajeva osteoporoze, 56% osteopenije i 26% ispitanika s zdravim skeletom detektiranih s DXA. Potom smo analizirali odvojeno podudarnosti QUS i DXA mjerenja za lumbalnu kralješnicu pozicije L1-L4 i isto tako rezultate za mjerenja kosti kuka. QUI T-vrijednost ≤ -1.8 identificirala je 100% osteoporoza kuka i 83% osteoporoza kralješnice. Kada je osteoporoza u bolesnika detektirana DXA mjerenjem na kralješnici i kuku, tada su sve tri QUS varijable imale T-vrijednost manju od -1.8 : BUA -3.0 (raspon -4.3 to -2.2), SOS -2.6 (raspon -3.2 to -1.85) i QUI -3.0 (raspon -3.7 to -2.2).

Rezultati



Slika 7.

Usporedba rezultata mjerenja koštanog statusa metodom klasične denzitometrije (DXA) i metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS). Nalazi kvantitativnog ultrazvuka petne kosti nisu pokazali dobru podudarnost s DXA mjerenjima (specifičnost 63%). Osjetljivost QUS metode u detekciji osteopenije je 84%, a samo 72% za osteoporozu.

5.1. EVALUACIJA KOŠTANOG STATUSA U BOLESNIKA S CROHNOVOM BOLESTI

Metabolička bolest kostiju tek je unatrag nekoliko godina prepoznata kao sistemna komplikacija upalnih bolesti crijeva (51). Nekoliko je zasebnih studija pokazalo da su bolesnici s upalnim bolestima crijeva znatno podložniji gubitku koštane gustoće koja seže od osteopenije do osteoporoze (52,53), što ovu populaciju čini rizičnom na koštane prijelome (30,54). U stvari, navedena su istraživanja pokazala da je metabolička bolest kostiju prisutna u visokom broju od 71% bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Podaci koji se temelje na mjerenjima klasične denzitometrije pokazali su prisutnost osteopenije u 40-50% bolesnika, dok je osteoporoza utvrđena u značajnih 30% (29). Navedenim je istraživanjima ujedno potvrđena veća zastupljenost metaboličke bolesti kostiju u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti u usporedbi s ulceroznim kolitisom (29,54,55). Iako etiologija metaboličke bolesti kostiju u IBD populaciji nije u potpunosti jasna drži se kako su pothranjenost, terapija kortikosteroidima, niska razina vitamina D uz manjak Ca^{2+} faktori koji imaju upliva na patogenezu (3). Uz poznate čimbenike rizika sve je više mišljenja da upala sama po sebi značajno utječe na proces gubitka koštane mase (4,56,39). Tome u prilog ide i podatak da je metabolička bolest kostiju identificirana kako u bolesnika liječenih kortikosteroidima tako i u onih bolesnika koji nisu primali prolongiranu terapiju steroidima (56,57,58,59). Rezultati ove disertacije mogu dati značajan doprinos u odgovoru na to pitanje. U ovom je istraživanju, temeljem denzitometrije kosti, utvrđeno da 53% novootkrivenih bolesnika s Crohnovom bolesti, ima sniženu mineralnu koštanu gustoću već pri dijagnozi osnovne bolesti (za detalje vidjeti Rezultati pod 4.4). To je vrijedan podatak i do sada nije zabilježen u postojećoj literaturi. Navedeno znači da se metabolička bolest kostiju počela razvijati vrlo rano i da nije mogla biti izazvana specifičnom terapijom za Crohnovu bolest. K tome je izuzetno važno naglasiti da je cijela ispitivana populacija bolesnika mlađe adultne dobi što isključuje već poznati utjecaj starenja na koštani status. Prema tome, razvijanje metaboličke bolesti kostiju u naivnih se bolesnika može shvatiti kao kolateralni učinak upalnog procesa *per se*. Kada se promatra

ukupna populacija bolesnika obuhvaćenih ispitivanjem onda su rezultati denzitometrije kosti u skladu s podacima koje nalazimo u literaturi (29). Normalan nalaz DXA mjerenja zabilježen je u 28% ispitanika, dok je u njih 72% detektirana snižena mineralna koštana gustoća i to osteopenija u 50% bolesnika ($-2.5 \leq T\text{-vrijednost} < -1.0$) ili već prisutna osteoporoza u njih 22% ($T\text{-vrijednost} \leq -2.5$).

5.2. UTJECAJ OSTEOKLASTIČNIH I PROUPALNIH PARAMETARA NA MINERALNU KOŠTANU GUSTOĆU

U pripremama za ovu studiju pošlo se od pretpostavke da u bolesnika s Crohnovom bolesti aktivirani imunološki sustav utječe na metabolizam kostiju. Naime, T-limfociti koji se aktiviraju vezanjem s antigenom, na svojim membranama eksprimiraju RANKL (40,41,60,61). Djelovanjem matriks metaloproteinaza molekule RANKL-a se isplavljaju u cirkulaciju. Cirkulirajući RANKL deriviran iz T-limfocita, kako navode studije, može direktno stimulirati sazrijevanje osteoklasta, te promovirati osteoklastične aktivnosti u smislu resorpcije koštanog matriksa (40,62). Međutim, funkcionalna povezanost između koštane homeostaze i imunološkog sustava, dokumentirana je za sada samo u eksperimentalnih životinja s iduciranim artritismom, peridontitisom ili deficitom estrogena, ali ne i u ljudi oboljelih od istih bolesti, pa tako niti u upalnim bolestima crijeva. Kako sinteza RANKL-a i osteoprotegerina u Crohnovoj bolesti može biti posljedica intestinalnog upalnog procesa, pretpostavljeno je da djelovanje RANKL, OPG i proupalnih citokina ne mora biti ograničeno isključivo na intestinalnu inflamaciju, već može posredno ili neposredno biti uključeno i u aktiviranje koštanog metabolizma. U svrhu testiranja navedene hipoteze, vrednovane su koncentracije RANKL-a i osteoprotegerina u serumima bolesnika s dugogodišnjom Crohnovom bolesti i naivnih bolesnika u kojih je bolest tek dijagnosticirana. Vrijednosti osteoklastičnih posrednika korelirane su potom s razinom proupalnih citokina, biokemijskim biljezima koštane izgradnje i razgradnje, te upoređene s

mineralnom koštanom gustoćom. Analizom rezultata utvrđeno je da bolesnici sa sniženom koštanom gustoćom imaju povišenu razinu osteoklastičnih posrednika i proupalnih citokina, bez obzira na duljinu trajanja bolesti. Tako je u dugogodišnjih bolesnika s Crohnovom bolesti koji imaju reduciranu koštanu gustoću, jednako kao i u novo dijagnosticiranih bolesnika s T-vrijednosti $\leq -1SD$, izmjerena koncentracija u perifernoj krvi za sRANKL, osteoprotegerin, TNF- α i IL-6 bila značajno viša nego li u istih bolesnika, ali bez nalaza metaboličke bolesti kostiju. Nalaz snižene mineralne koštane gustoće pri dijagnozi Crohnove bolesti bez sumnje podupire hipotezu kako upalni proces *per se* doprinosi razvoju metaboličke bolesti kostiju. Naše zapažanje da središnji proupalni citokin TNF- α vrlo usko i statistički značajno korelira s osteoklastičnim medijatorom RANKL je dodatna činjenica u prilog navedenoj hipotezi. S tim je u skladu i podatak da je u naivnih bolesnika nađena značajna, ali negativna korelacija između koncentracija TNF- α i vrijednosti mineralne gustoće kostiju kralježnice i kuka. Točnije visoka razina središnjeg proupalnog citokina povezana je s nižim vrijednostima mineralne gustoće kostiju. U nastavku su analizirani parametri signalnog puta RANK/RANK-ligand/osteoprotegerin koji je zapravo poveznica između imunološkog i koštanog sustava (41,62). Dok je slobodni RANKL biološki aktivan i potiče osteoklastične aktivnosti, vezanje za receptor i stvaranje kompleksa s osteoprotegerinom ga uvjetno rečeno deaktivira. U ovom je radu zabilježeno da koncentracije slobodnog RANKL-a i osteoprotegerina koreliraju inverzno. Takva je negativna korelacija nađena samo u skupinama bolesnika s niskom mineralnom gustoćom kosti, dok u Crohnovih bolesnika sa zdravim skeletom nema nikakve povezanosti između tih dvaju parametara. Nalaz visokih vrijednosti osteoprotegerina samo u bolesnika s aktivnim metaboličkim procesom resorpcije kosti može se protumačiti i kao odgovor na pojačanu produkciju čimbenika koji razgrađuju koštani matriks. (63,64,65). Pri tome, a uslijed stvaranja kompleksa OPG-RANKL, dolazi do pada koncentracije slobodnog, osteoklastično aktivnog RANKL-a, pa i njihova korelacija u cirkulaciji poprima negativan predznak. Poznato je da intestinalne imunološke stanice sintetiziraju i luče RANKL i OPG, pa tako na molekularnoj osnovi povezuju koštani i imunološki sustav (62). Moguće je stoga da su

navedeni parametri podjednako odraz osteoklastičnih aktivnosti kao i aktivnost intestinalne upale (42). Takvo objašnjenje i shvaćanje iznesenih rezultata može najbolje objasniti vrlo blisku korelaciju između koncentracija slobodnog RANKL-a i TNF- α .

TNF- α je središnji proupalni medijator i njegova se obilna sinteza u Crohnovoj bolesti prema mnogim istraživanjima izravno povezuje s patogeneзом bolesti (66). U ovom je radu u skupini novo dijagnosticiranih bolesnika s Crohnovom bolesti utvrđena vrlo dobra i statistički značajna korelacija između koncentracija TNF- α i sRANKL, a ta je pozitivna korelacija ostala nepromjenjenom i u bolesnika s dugogodišnjim trajanjem bolesti. Štoviše analiza multiple regresije korak-po-korak razotkrila je TNF- α kao najbolji prediktivni parametar za generiranje RANKL-a. U koštanoj homeostazi, na razini stanica, za sada nije potpuno precizno razjašnjeno ciljno djelovanje TNF- α , pa niti kakva je pri tome njegova sprega s RANKL-om. Opisano je samo, da vezanje TNF- α za membranski TNF-receptor putem adapterskog proteina p55, pojačava staničnu sintezu i lučenje RANKL-a (67,68). S tim u vezi nalazim zanimljivim istraživanje Byrne i suradnika (64) koje je provedeno na eksperimentalnom modelu Crohnove bolesti. U miševa s induciranim kolitisom, autori su ispitali nastanak osteopenije moguće uzrokovane pothranjenošću, poremećajem regulacije probavnog trakta, odnosno posljedičnim upalnim procesom. Imunodeficitarnim je miševima transferiran soj CD4⁺CD45RB^{Hi} T limfocita što je u ispitivanih životinja, uz kolitis, rezultiralo značajanim gubitakom koštane gustoće. Autori su utvrdili da postoji izravna povezanost između izlučenog TNF- α i koncentracije RANKL koji je kao posrednik potaknuo stanice osteoklasta u koštanoj destruktiji. Zaključili su da je upala primarni uzrok u gubitku koštane gustoće. U osnovi je Crohnove bolesti poremećen imunološki odgovor crijevne sluznice s nereguliranom aktivacijom i proliferacijom T limfocita te aktivacijom makrofaga i otpuštanjem proinflammatoryh citokina (4). Aktivirane antigen prezentirajuće stanice, makrofazi i dendritične stanice, induciraju Th1 tip imunog odgovora sekrecijom interleukina. Povišene vrijednosti citokina i faktora rasta nađene su kako u serumu tako i u mukozi inflamiranog crijeva. Limfocitna akumulacija u mukozi i rezistencija aktiviranih T stanica na apoptozu pogoduju održavanju

kronične upale. Migracija aktiviranih T limfocita iz sistemne cirkulacije u različita tkiva, uključivo koštanu srž, može pogodovati razvoju izvancrijevnih manifestacija Crohnove bolesti (69,70). Tako primjerice, povećan broj aktiviranih T limfocita u koštanom tkivu, koji pojačano luče TNF- α i RANKL, može biti mehanizam putem kojeg se u Crohnovoj bolesti odvija koštana erozija, i to potpuno neovisno od liječenja osnovne bolesti (71,72). Ovakav pristup ovom problemu ima i nešto širiju aplikaciju jer osim upalnih bolesti crijeva postoji niz drugih bolesti u kojih se uz aktivni upalni proces sekundarno razvija i metabolička bolest kostiju. Istraživanja u ovom pravcu mogla bi dati objašnjenje problema na molekularnoj razini, a potom pripomoći u načinu liječenja. Kad se već spominje liječenje Crohnove bolesti svakako treba reći da je terapija s protutijelima na TNF- α pokazala određeni benefit prema metaboličkoj bolesti kostiju (73,74,75,76). Tako je u nekim studijama naglašeno da je terapija infliximabom pozitivno djelovala na parametre koštane izgradnje, ali bez učinka na koštanu resorpciju (74), dok je u drugim studijama zapažen pozitivan učinak na kompletnu homeostazu, točnije uravnoteženje koštane izgradnje i koštane razgradnje (75). Terapija infliximabom ispitivana je također u reumatoidnom artritisu. Tu je vrlo zanimljiva studija Gengenbacher i suradnika (76) u kojoj su autori opisali kako je blokiranje TNF- α infliximabom značajno smanjilo koštanu resorpciju, zato što je reducirana broja prekursorskih stanica osteoklasta. Studija ima dodatnu vrijednost jer je istraživanje provedeno u ljudi oboljelih od reumatoidnog artritisa.

Interleukin-6 je multifunkcionalan citokin, koji pored učinaka imunoregulacije, ima nedovoljno definiranu ulogu u osteoklastičnoj koštanoj resorpciji. Sintetiziraju ga i luče, osim imunoloških i druge stanice, uključivo stromalne koštane stanice. Pretpostavlja se kako podržava razvijanje osteoklasta iz mladih hematopoetskih stanica. U ispitivanoj populaciji bolesnika s Crohnovom bolesti, kako onih s dugogodišnjim trajanjem bolesti tako i u novo otkrivenih bolesnika, izmjerena je povišena razina IL-6. Povišena razina IL-6 u bolesnika s upalnim bolestima crijeva je podatak poznat iz literature (77,78). No, u ovom je radu utvrđeno da su koncentracije značajno više u bolesnika u kojih je prisutna metabolička bolest kostiju u odnosu na ispitanike s urednim koštanim statusom.

Najviša koncentracija IL-6 izmjerena je u sistemnoj cirkulaciji bolesnika koji uz Crohnovu bolest imaju osteoporozu. Isto tako u skupini naivnih bolesnika s reduciranom koštanom gustoćom razina IL-6 je gotovo dvostruko viša nego li u ostatku bolesnika zdravog skeleta. Povišena razina IL-6 negativno korelira s izmjerenom mineralnom koštanom gustoćom, iako je ta korelacija značajnija za kosti kralješnice. To se može objasniti činjenicom da je kralješnica građena od trabekularne kosti koja je metabolički aktivnija od kortikalne kosti kuka. Međutim, kakva je točno ciljna uloga IL-6 u koštanoj resorpciji, a što bi bilo specifično za Crohnovu bolest, teško je reći na osnovu podataka s kojima se raspolaže u ovoj studiji. Možda može biti od koristi citiranje rada Sylvester i sur. (78) u kojem je *in vitro* utvrđeno da IL-6 iz seruma bolesnika s Crohnovom bolesti inhibira proces mineraliziranja kosti. Autori studije, su u zaključku istaknuli kako povišena koncentracija ovog interleukina u sistemnoj cirkulaciji, može biti dodatni poticaj u nastanku osteopenije i daljnjem koštanom propadanju u Crohnovoj bolesti. Koncentracije IL-6 izmjerene u naših bolesnika su vrlo dobro korelirale s razinom TNF- α . Kao što je poznato TNF- α zajedno s IL-1 β stimulira sintezu i lučenje IL-6, koji opet zajedno sa spomenutim citokinima čini dio mreže proupalnih citokina. Stoga se njihova međusobno odlična korelacija može objasniti podatkom da se tijekom aktivnog stadija bolesti svi proupalni citokini pojačano generiraju, a IL-6 je pri tome samo posljednji u nizu i najdulje se zadržava u cirkulaciji.

5.3. BILJEZI KOŠTANE PREGRADNJE

Obzirom na učestalu pojavu metaboličke bolesti kostiju u Crohnovoj bolesti, pretpostavljeno je, da će u istih bolesnika biti registrirana izražena aktivnost parametara koštane izgradnje i razgradnje. Međutim prosječna razina osteokalcina, koji obilježava koštanu izgradnju, nije se razlikovala od vrijednosti u kontrolnoj skupini. S druge strane, u serumima oboljelih od Crohnove bolesti zabilježena je značajno viša koncentracija C-telopeptida, koji je razgradni produkt kolagena koštanog matriksa. U više od 50% bolesnika izmjerena razina C-telopeptida u krvi prelazila je gornju granicu normalne vrijednosti ustanovljene

za zdrave muške osobe i žene prije menopauze. Za podskupinu bolesnika s visokim parametrom koštane resorpcije karakteristična je i povišena koncentracija TNF- α , IL-6, CRP i osteoprotegerina, sve redom parametara upalne aktivnosti. Potrebno je još istaknuti podatak da je u 22% bolesnika izmjerena značajno snižena koncentracija osteokalcina, niža od 3 ng/ml, što je donja granica u rasponu normalnih vrijednosti. Od ovih je bolesnika njih 80% bilo na aktualnoj terapiji kortikosteroidima. Kao što je poznato, jedna od neželjenih popratnih pojava primjene kortikosteroida ogleda se u inhibiranju puteva koštane izgradnje. Rezultati ove studije pokazuju kako je u bolesnika s Crohnovom bolesti poremećena ravnoteža izgradnje i razgradnje koštanog tkiva. Navedeno je u skladu s već opisanim zapažanjima iz literature (59,64,79). Međutim, prema rezultatima izmjerenim u skupini naivnih bolesnika sa sniženom mineralnom koštanom gustoćom čini se kako proces koštane resorpcije dominira, dok terapija kortikosteroidima kasnije u fazi liječenja ima sinergistički učinak jer inhibira *de novo* sintezu koštanog matriksa.

5.4. VREDNOVANJE MJERENJA ULTRAZVUKA PETNE KOSTI U ODREĐIVANJU KOŠTANOG STATUSA

Orkestrirana aktivnost proupalnih i osteoklastičnih molekula dio je patološkog procesa u propadanju koštanog tkiva, koji predhodi klinički evidentnoj koštanoj bolesti. Kao što smo već prikazali tijekom ove je studije uočeno kako 50% bolesnika pri dijagnozi ima reduciranu mineralnu gustoću kostiju. Zatim, liječenje kortikosteroidima učestalo razvijaju neželjene popratne pojave u koštanoj homeostazi. K tome se treba nadodati kako je dugogodišnje trajanje bolesti povezano s kroničnom remitentnom upalom koja sama po sebi pogoduje nastanku metaboličke bolesti kostiju. Sve navedene činjenice govore u prilog koštanog propadanja. Iz tih se razloga, u bolesnika s Crohnovom bolesti, u svakodnevnoj rutinskoj praksi, nameće sve veća potreba za kontrolnim mjerenjima koštanog statusa (80,81,82). Danas je kao standard opće prihvaćena metoda dvostruke apsorpciometrije X-zraka (DXA). Međutim, kako se u bolesnika s upalnim bolestima crijeva koštana patologija razvija u mlađoj dobi, a progredira relativno brzo, veća je i potreba za učestalijim skeniranjem

kostiju nego li primjerice u osteoporozi koja se razvija u postmenopauzi. No, klasična se denzitometrija bazira na ionizirajućem zračenju što je glavni razlog zašto bi u naših bolesnika bilo pogodnije koristiti neku od alternativnih tehnologija. Metoda kvantitativnog ultrazvuka (QUS) petne kosti učinila se u tu svrhu vrlo zanimljivom (83). To je neinvazivna metoda, bez ionizirajućeg zračenja, a parametri koji rezultiraju mjerenjem, podjednako uspješno pokazuju kakvoću koštane strukture i koštanu masu (84). Tehnički je jednostavna i lako dostupna jer se rabi instrument koji je lako pokretljiv i k tome nije skup. QUS tehnologija je posebno pogodna za mjerenja perifernih kosti primjerice petne kosti, falange ili tibije (49).

Što se tiče rezultata mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u ispitivanih bolesnika s upalnim bolestima crijeva bitno je naglasiti slijedeće. Prvo, svi su QUS parametri značajno niži u bolesnika nego li u zdravih dobrovoljaca koji su po dobi i spolu odgovarali populaciji s upalnim bolestima crijeva. Drugo, uočena je statistički značajna razlika između prosječnih vrijednosti unutar podskupina bolesnika koji su imali koštanih prijeloma i bolesnika bez koštanih fraktura. Treće, kvantitativni ultrazvuk nije niti jedan slučaj osteoporoze lažno prepoznao kao normalan koštani status. Kao posljednje, svi se QUS parametri negativno, ali statistički značajno odnose prema duljini trajanja bolesti. Unatoč navedenih činjenica, ali zbog niske specifičnosti (63%) i pozitivne prediktivne vrijednosti (78%) uz osjetljivost od 93%, ipak nije moguće prihvatiti metodu kvantitativnog ultrazvuka kao alternativu klasičnoj denzitometriji. Ovdje iznesena zapažanja su u skladu s rezultatima nekih već ranije objavljenih studija (85,86,87,88,89), iako ima i drugih studija suprostavljenih rezultata koje iznose kako je QUS korisna metoda u praćenju metaboličke bolesti kostiju (83,90,91,92). Schwartz i suradnici (88) su komparirali rezultate QUS i DXA mjerenja u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (njih 62% s DXA T-vrijednost ≤ -1.0), ali zbog niske osjetljivosti i specifičnosti nisu preporučili QUS petne kosti kao klinički pouzdanu zamjenu za klasičnu denzitometriju. Slično je u studiji skandinavskih autora, Jansen i suradnika (85), koji su našli da koeficijent korelacije između QUS i DXA rezultata varira od 0.50 do 0.67, uz nisku podudarnost individualnih vrijednosti. U našem ispitivanju, osjetljivost QUS metode od 93%, pokazuje da

je 7% bolesnika s klinički potvrđenom koštanom bolesti, ipak lažno klasificirano kao zdravi skelet. Specifičnost od 63% indicira pak da je 37% ispitanika s normalnim koštanim statusom lažno svrstano u metaboličku bolest kostiju. Međutim, ovdje se mora reći da su svi bolesnici koji su klasificirani kao lažno pozitivni, prema QUS parametrima imali varijabilne osteopenije, i niti jedan nije lažno identificiran kao slučaj osteoporoze. Međutim, kako se čini, najveći nedostatak QUS kao alternative DXA mjerenja, leži u činjenici što QUS metoda ne može uspješno razlučiti osteoporozu od osteopenije. U ovom se radu to odnosi na 28% slučajeva. Uspješno odvajanje osteoporoze od osteopenije je od kliničkog značenja kao preduvjet za terapiju moćnim antiresorpcijskim lijekovima.

Međutim, zbog toga što je mjerenje perifernih kostiju kvantitativnim ultrazvukom metoda poštena za bolesnika i stoga što je vrlo praktična u svojoj primjeni, učinjeni su dodatni pokušaji u njezinom kliničkom vrednovanju. Tako su Frost i suradnici (50) iznijeli mišljenje da se WHO kriterij (T-vrijednost ≤ -2.5) za dijagnozu osteoporoze u žena u menopauzi ne može jednostavno primijeniti na parametre kvantitativnog ultrazvuka. Naime, QUS parametri BUA i SOS ne odražavaju mineralnu gustoću kostiju, na čemu se temelji WHO klasifikacija. Iz tog su razloga navedeni autori predložili da se kao kriterij za osteoporozu dijagnosticiranu QUS-om, uzme T-vrijednost ≤ -1.8 . Slijedeći opisani pristup, u ovom su radu re-evaluirana sva QUS mjerenja i točno je identificirano 83% osteoporoza lumbalne kralješnice i 100% osteoporoza u kostima kuka. Nažalost, u podskupinu bolesnika s QUI T-vrijednosti ≤ -1.8 pogrešno se uključilo i 26% bolesnika sa zdravim skeletom. Problem kako koristiti QUS parametre u kliničkoj praksi analizirali su Nayak i suradnici (93). U opširnom revijalnom prikazu zbirno su saželi sve dostupne podatke iz literature, te su uz pomoć meta-analize zaključili da se QUS mjerenjima ne može ni potvrditi niti zanijekati osteoporoza dijagnosticirana DXA nalazom.

Učestalo razvijanje metaboličke bolesti kostiju čini populaciju bolesnika s upalnim bolestima crijeva, rizičnom za koštane prijelome. Međutim, istraživanja u kojima su vrednovani rezultati klasične denzitometrije, nisu potvrdile značajnost mjerenja mineralne gustoće kostiju kao prediktivnog parametara za

incidenciju koštanih fraktura u IBD populaciji (59,94). U našoj je skupini bolesnika 23% izjavilo da su imali jedan ili više koštanih prijeloma. Naknadno se pokazalo da je to podskupina bolesnika s najnižom prosječnom vrijednosti svih parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti. Slično je zapažanje nešto ranije iznjela grupa autora u radu Jahnsen i suradnici (85). Oni su našli značajno niže vrijednosti samo za parametar BUA koji se odnosi na arhitekturu kosti, ali ne za SOS koji odražava mineralnu gustoću kosti. Što se tiče DXA mjerenja u bolesnika sa i bez koštanih fraktura, nema razlika u nalazu mineralne gustoće kralješnice, dok je nalaz kosti kuka statistički značajno niži u bolesnika s koštanim prijelomima u povijesti bolesti. Općenito možemo reći da kvantitativni ultrazvuk petne kosti prema rezultatima prikazanog istraživanja nije pouzdana zamjena za metodu klasične denzitometrije, no može poslužiti kao komplementarna opcija jer se pokazalo da je dobar prediktivni parametar za rizik na koštane prijelome (95).

Zaključci

- U ovom je istraživanju temeljem denzitometrije kosti, utvrđeno da 53% novootkrivenih bolesnika s Crohnovom bolesti već pri dijagnozi osnovne bolesti, ima sniženu mineralnu koštanu gustoću.
- U ukupnoj populaciji bolesnika s Crohnovom bolesti, u njih 72% ustanovljena je snižena mineralna gustoća kosti: osteopenija u 50%, a već prisutna osteoporoza u 22% ispitanika.
- Bolesnici sa sniženom mineralnom gustoćom kostiju, u sistemnoj cirkulaciji imaju povišene aktivnosti osteoklastičnih posrednika, proupalnih citokina i biljega koštane razgradnje.
- U naivnih je bolesnika zabilježena odlična korelacija između središnjeg proupalnog citokina TNF- α i osteoklastičnog posrednika sRANKL (liganda za receptor aktivirajući transkripcijski čimbenik NF κ B), a ta je pozitivna korelacija ostala nepromjenjenom i u skupini bolesnika s dugogodišnjim trajanjem Crohnove bolesti.
- Koncentracije sRANK-liganda i njegovog dekodirajućeg receptora osteoprotegerina, koreliraju inverzno u bolesnika s niskom mineralnom gustoćom kostiju, dok u bolesnika sa zdravim skeletom nema nikakve povezanosti. Obilna sinteza osteoprotegerina, zabilježena samo u bolesnika s aktivnim metaboličkim procesom resorpcije kosti, može se protumačiti kao odgovor na pojačanu produkciju čimbenika koji razgrađuju koštano tkivo.
- Rezultati ove studije koji se odnose na novo dijagnosticirane bolesnike s Crohnovom bolesti snažno podupiru hipotezu da upalni proces *per se* ima primarnu ulogu u razvijanju i progresiji metaboličke bolesti kostiju.

Zaključci

- Kvantitativni ultrazvuk petne kosti prema rezultatima prikazanog istraživanja nije pouzdana zamjena za metodu klasične denzitometrije, no može poslužiti kao komplementarna pretraga jer se pokazalo da je dobar prediktivni parametar za rizik koštanih prijeloma.

Bibliografija

1. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: Vucelić B. i sur. (ur.) Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2002, str 723-60.
2. Lichtenstein GR. The clinician's guide to inflammatory bowel disease. Slack Incorporated, Thorofare, NJ, USA, 2003.
3. Colombel J.F, Gasche C, Scholmerich J, Vucelić B, (eds). Inflammatory bowel disease: Translation from basic research to clinical practice. Falk symposium 140, Springer, 2005.
4. Bamias G, Nyce MR, De LaRue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. Ann Intern Med. 2005;143:895-904.
5. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex disease? Lancet. 2006;367:1271-1284.
6. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. J Gastroenterol 2007;42:16-25
7. Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. Biochem Cell Biol. 1996;74:749-757.
8. Jones SC, Banks RE, Haider A et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Gut 1995;36:724-730.
9. Louis E, Michel V, Hugot JP et al. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. Gut 2003;52:552-557.
10. Lesage S, Zouali H, Cezard JP et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002;70:845-857.
11. Helio T, Halme L, Lappalainen M et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occuring and complicated forms of Crohn's disease. Gut.2003;52:558-562.
12. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in in patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 2002;123:679-688.
13. Mirza MM, Fischer SA, King et al. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. Am J Hum Genet. 2003;72:1018-1022.

14. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunol* 2004;5:800-808.
15. Maeda S, Hsu LC, Liu H et al. NOD2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 β processing. *Science* 2005;307:734-738.
16. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implication for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-5512.
17. Li J, Moran T, Swanson E et al. Regulation of IL-8 and IL-1 β expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1715-1725.
18. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34:2052-2059.
19. Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus* 2006;15:53-62.
20. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G et al. for European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*. 2006;55 Suppl 1:i36-58.
21. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's disease activity index (CDAI). *Gastroenterology*. 1979;77:843-846.
22. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet*. 1980;1:514-519.
23. 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(4):279-286.
24. Sripathi R. Kethu. Extraintestinal manifestations of Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:467-475.
25. Peeters H, Vander CB, Laukens D et al. Radiological sacroileitis, a hallmark of spondylitis, is linked with CARD15 gene polymorphisms in patients with Crohn's disease. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:1131-1134.
26. Esters N, Pierik M, van Steen K et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:299-305.

Bibliografija

27. Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI et al. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000;118:274-278.
28. Das KM. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease. New insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1-13.
29. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. American Gastroenterological Association technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*. 2003;124:795-841.
30. Bernstein CN, Blanchard JF, Leslie W, et al. The incidence of fracture among patients with inflammatory bowel disease. A population-based cohort study. *Ann Intern Med*. 2000;133:795-799.
31. Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L et al. Fracture risk is increased in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Gut*. 2000;46:176-181.
32. Loftus EV, Crowson CS, Sandborn WJ, et al. Long-term fracture risk in patients with Crohn's disease: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*. 2002;123:468-475.
33. Siffledeen JS, Siminoski K, Jen H, Fedorak RN. Vertebral fractures and role of low bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:721-728.
34. Klaus J, Armbrrecht G, Steinkamp M et al. High prevalence of osteoporotic vertebral fractures in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2002;51:654-658.
35. Driscoll RH Jr, Meredith SC, Sitrin M, Rosenberg IH. Vitamin D deficiency and bone disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1982;83:1252-1258.
36. Vogelsang H, Schofl R, Tillinger W, Ferenci P, Gangl A. 25-hydroxy-vitamin D absorption in patients with Crohn's disease and with pancreatic insufficiency. *Win Klin Wochenschr*. 1997;109:678-682.
37. Andreassen H, Rungby J, Dahlerup JF, Mosekilde L. Inflammatory bowel disease and osteoporosis. *Scand J Gastro*. 1997;32:1247-1255.
38. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C et al. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40:228-233.
39. Siffledeen JS, Fedorak RN, Siminoski K, Jen H, Vaudan E, Abraham N, Seinhart H, Greenberg G. Bones and Crohn's: risk factors associated with low bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:220-228.

40. Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2355-2363.
41. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000;21:495-502.
42. Franchimont N, Reenaers C, Lambert C, Belaiche J, Bours V, Malaise M, Delvenne P, Louis E. Increased expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2004;138:491-8.
43. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C et al. for European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006;55:(Suppl 1):1-15.
44. Bossuyt X. Serologic markers in Inflammatory bowel disease. *Clin Chemistry* 2006;52:171-181.
45. Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T et al. for European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*. 2006;55 (suppl 1):116-35.
46. Kastelan D, Kujundzic-Tiljak M, Kraljevic I, Kardum I, Giljevic Z, Korsic M. Calcaneus ultrasound in males – normative data in the Croatian population (ECUM study). *J Endocrinol Invest* 2006;29:221-225.
47. Krznarić Ž. Klinička prehrana u gastroenterologiji. *Medicus* 2006;15:169-181.
48. WHO Study group report: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843:1-129.
49. Cook RB, Collins D, Tucker J, Zioupos P. The ability of peripheral quantitative ultrasound to identify patients with low bone mineral density in the hip or spine. *Ultrasound in Med Biol* 2005;31:625-32.
50. Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporos Int* 2000;11:321-330.

Bibliografija

51. Lichtenstein GR. Evaluation of bone mineral density in inflammatory bowel disease: current safety focus. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:S24-30.
52. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, et al. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:228-233.
53. Schulte C, Dignass AU, Mann K, Goebell H. Reduced bone mineral density and unbalanced bone metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:268-275.
54. Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L, et al. Fracture risk is increased in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Gut* 2000;46:176-181.
55. Jahnsen J, Falch JA, Aadland E et al. Bone mineral density is reduced in patients with Crohn's disease, but not in patients with ulcerative colitis: a population based study. *Gut* 1997;40:313-319.
56. Card T, West J, Hubbard R, et al. Hip fractures in patients with inflammatory bowel disease and their relationship to corticosteroid use: a population based cohort study. *Gut* 2004;53:251-5.
57. Schoon EJ, Geerling BG, Van Dooren IMA, et al. Abnormal bone turnover in long-standing Crohn's disease in remission. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:783-92.
58. Schoon EJ, Blok BM, Geerling BJ, et al. Bone mineral density in patients with recently diagnosed inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119:1203-8.
59. Lee SH, Kim HJ, Yang SK, et al. Decreased trabecular bone mineral density in newly diagnosed inflammatory bowel disease patients in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:512-8.
60. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol* 2000;35:947-56.
61. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154-68.
62. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304.
63. Bernstein CN, Sargent M, Leslie WD. Serum osteoprotegerin is increased in Crohn's disease: a population-based case control study. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:325-30.

64. Byrne FR, Morony S, Warmington K, et al. D4(+)CD45RB(Hi) T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut* 2005;54:78-86.
65. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut* 2005;54:479-87.
66. Tilg H. Role of cytokines and their receptors in inflammatory bowel diseases. In: Colombel JF, Gasche C, Scholmerich J, Vucelić B, eds. *Inflammatory bowel disease: translation from basic research to clinical practice*. Falk Symposium 140, Heidelberg, Springer-Verlag, 2005; 83-9.
67. Roggia C, Gao YH, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13960-5.
68. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis *via* coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:563-8.
69. Kethu SR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel diseases. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:467-75.
70. Westermann J, Engelhardt B, Hoffmann JC. Migration of T cells *in vivo*: molecular mechanisms and clinical implications. *Ann Intern Med* 2001;135:279-95.
71. Gordon CM. Bone loss in children with Crohn disease: evidence of "osteimmune" alterations. *J Pediatr* 2006;148:429-32.
72. Sylvester FA, Davis PM, Wyzga N, et al. Are activated T cells regulators of bone metabolism in children with Crohn disease? *J Pediatr* 2006;148:461-6.
73. Bernstein M, Irwin S, Greenberg GR. Maintenance infliximab treatment is associated with improved bone mineral density in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2031-5.
74. Abreu MT, Geller JL, Vasiliauskas EA, et al. Treatment with infliximab is associated with increased markers of bone formation in patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:55-6.
75. Franchimont N, Putzeys V, Collette J, et al. Rapid improvement of bone metabolism after infliximab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:607-14.

76. Gengenbacher M, Sebald HJ, Villiger PM, et al. Infliximab inhibits bone resorption by circulating osteoclast precursor cell in patients with Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:620-624
77. Dresner-Pollak R, Karmeli F, Eliakim R, et al. Femoral neck osteopenia in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1483-90.
78. Sylvester FA, Wyzga N, Hyams JS, et al. Effect of Crohn's disease on bone metabolism *in vitro*: a role for interleukin-6. *J Bone Miner Res* 2002;17:695-702.
79. Ardizzone S, Bollani S, Bettica P, et al. Altered bone metabolism in inflammatory bowel disease: there is a difference between Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Intern Med* 2000;247:63-70.
80. Kirchgatterer A, Wenzl HH, Aschl G et al. Examination, prevention and treatment of osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease: Recommendations and reality. *Acta Med Austriaca* 2002;29:120-23.
81. Papaionnou A, Ferko NC, Adachi JD. All patients with inflammatory bowel disease should have bone density assessment: pro. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:158-62.
82. Valentine JF, Sninsky CA. Prevention and treatment of osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:878-83.
83. Fries W, Dinca M, Luisetto G et al. Calcaneal ultrasound bone densitometry in inflammatory bowel disease - A comparison with double X-ray densitometry of the lumbar spine. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2339-44.
84. Bouxsein ML, Radloff SE. Quantitative ultrasound of the calcaneus reflects the mechanical properties of calcaneal trabecular bone. *J Bone Miner Res*. 1997;12:839-46.
85. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E. Ultrasound measurements of calcaneus for estimation of skeletal status in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:790-97.
86. Levine A, Mishna L, Ballin A et al. Use of quantitative ultrasound to assess osteopenia in children with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:169-72.

Bibliografija

87. Robinson RJ, Carr I, Iqbal SJ et al. Screening for osteoporosis in Crohns disease - a detailed evaluation of calcaneal ultrasound. *Euro J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:137-40.
88. Schwartz DA, Connolley CD, Koyama T, Wise PE, Herline AJ. Calcaneal ultrasound bone densitometry is not useful tool to screen patients with inflammatory bowel disease at high risk for metabolic bone disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:749-54.
89. von Tirpitz C, Klaus J, Steinkamp M et al Quantitative ultrasound of the proximal phalanges and dual-energy X-ray absorptiometry in Crohn's disease patients with osteopenia. *J Gastroenterol* 2003;38:238-43.
90. Hartman C, Hino B, Lerner T, Eshach-Adiv O, Berkowitz D et al. Bone quantitative ultrasound and bone mineral density in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:504-10.
91. Javaid MK, McCrudden PR, Taylor P et al. Comparison of calcaneal ultrasound and DXA to assess the risk of corticosteroid-induced osteoporosis: A cross-sectional study. *Osteoporos Int* 2001;12:788-93.
92. Zadik Z, Sinai T, Zung A, Reifen R. Longitudinal monitoring of bone measured by quantitative multisite ultrasound in patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:120-3.
93. Nayak S, Olkin I, Liu H. et al. Meta-analysis: Accuracy of quantitative ultrasound for identifying patients with osteoporosis. *Ann Intern Med* 2006;144:832-41.
94. Stockbrügger RW, Schoon EJ, Bollani S et al. Discordance between the degree of osteopenia and the prevalence of spontaneous vertebral fractures in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1519-27.
95. Turk N, Kastelan D, Čuković-Čavka S, et al. Discriminatory ability of calcaneal quantitative ultrasound in the assessment of bone status in patients with inflammatory bowel disease. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:863-9.

Popis kratica

ANCA	- antineutrofilna citoplazmatska antitijela
ASCA	- antitijela na <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CARD	- kaspasa-aktivirajuća i regrutirajuća domena
CDAI	- indeks aktivnosti Crohnove bolesti
CRP	- C-reaktivni protein
CT	- kompjuterizirana tomografija
DXA	- dvostruka apsorpciometrija X-zraka
GERB	- gastroezofagealna refluksna bolest
HLA	- ljudski leukocitni antigeni
ICAM	- intracelularna adhezijska molekula
IL	- interleukin
MR	- magnetska rezonancija
NOD2	- nukleotid oligomerizirajuća domena 2
NSAR	- nesteroidni antireumatici
OPG	- osteoprotegerin
RANK	- receptor aktivatora nuklearnog faktora kappa B
RANKL	- ligand za receptor aktivatora nuklearnog faktora kappa B
SAA	- serumski amiloid A
SE	- sedimentacija eritrocita
TNF α	- tumor nekrotizirajući čimbenik α
VCAM	- vaskularna stanična adhezijska molekula

METABOLIČKA BOLEST KOSTIJU U CROHNOVOJ BOLESTI

Svrha/Ciljevi

Metabolička bolest kostiju je učestala ekstraintestinalna manifestacija Crohnove bolesti. Patogeneza nije u potpunosti jasna, no kako se javlja u bolesnika koji jesu, ali i u onih koji nisu liječeni kortikosteroidima, prepostavlja se da sam upalni proces ima značajnog upliva na koštani metabolizam. Stoga je cilj ovog istraživanja bio komparativno evaluirati proupalne citokine, biljege koštane izgradnje i razgradnje, te regulatorne molekule u biogenezi osteoklasta RANKL i osteoprotegerin (OPG), u skupinama bolesnika s Crohnovom bolesti sa i bez metaboličke bolesti kostiju.

Bolesnici i metode

Ispitivanu skupinu od 95 bolesnika činilo je njih 80 s dugogodišnjim trajanjem Crohnove bolesti i 15 bolesnika u kojih je bolest tek dijagnosticirana. Koncentracije sRANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , IL-6, osteokalcina i C-telopeptida u serumu, određivane su imunološkim metodama. Koštani je status mjeren metodom dvostruke apsorpciometrije X-zraka (DXA) određivanjem mineralne gustoće kostiju (BMD) lumbalne kralješnice i kuka, te uporedo, metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS).

Rezultati

U skupini s tek dijagnosticiranom Crohnovom bolesti 53% bolesnika ima sniženu mineralnu koštanu gustoću, dok je u bolesnika s dugogodišnjim trajanjem bolesti osteoporoza prisutna u njih 26%. U naivnih je bolesnika zabilježena vrlo dobra korelacija između središnjeg proupalnog citokina TNF- α i osteoklastičnog posrednika sRANKL ($r=0.6$; $p=0.027$), a ta je pozitivna korelacija ostala nepromjenjenom i u skupini bolesnika s višegodišnjim trajanjem bolesti ($r=0.3$; $p=0.009$). Koncentracije slobodnog RANKL-a i njegovog receptora OPG koreliraju negativno u bolesnika sa sniženom mineralnom gustoćom kostiju ($r=-$

0.36; $p=0.003$), dok u bolesnika sa zdravim skeletom nema međusobne povezanosti. U naivnih bolesnika s reduciranom mineralnom gustoćom kostiju (T-vrijednost ≤ -1.0), korelacija između RANKL-a i OPG je izrazito visoka, ali s negativnim predznakom ($r=-0.8$; $p=0.02$). Tu podskupinu bolesnika ujedno karakterizira niži indeks tjelesne mase, značajno viša koncentracija proupalnih citokina, visoka razina CRP i pojačane aktivnosti RANKL i OPG.

Nalazi kvantitativnog ultrazvuka petne kosti nisu pokazali dobru podudarnost s DXA mjerenjima (specifičnost 63%). Osjetljivost QUS metode u detekciji osteopenije je 84%, a 72% za osteoporozu. Međutim QUS petne kosti je uspješnija metoda u identificiranju bolesnika s rizikom koštanih prijeloma.

Zaključci

Rezultati ove studije snažno podupiru hipotezu da upalni proces *per se* u Crohnovoj bolesti ima primarnu ulogu u razvijanju i napredovanju metaboličke bolesti kostiju. U prilog izrečenom govori podatak da središnji proupalni citokin TNF- α vrlo pozitivno korelira s osteoklasičnim posrednikom RANKL, a negativno s mineralnom koštanom gustoćom. Klinički se to ogleda u činjenici da 50% naivnih bolesnika već pri dijagnozi ima nižu koštanu gustoću.

Kvantitativni ultrazvuk petne kosti prema rezultatima prikazanog istraživanja nije pouzdana zamjena za metodu klasične denzitometrije, no može poslužiti kao komplementarna opcija jer se pokazalo da je dobar prediktivni parametar za rizik na koštane prijelome.

METABOLIC BONE DISEASE AND CROHN'S DISEASE

Objective

The high incidence of bone disease and increasing evidence for Crohn's disease (CD) affecting bone status in corticosteroid users and non-users suggest that bone metabolism is affected by inflammatory process. This study aimed to determine comparative serum levels of proinflammatory cytokines, markers of bone formation and resorption, and regulatory molecules of osteoclast biogenesis RANKL and osteoprotegerin (OPG), in CD patients with and without metabolic bone disease.

Patients and Methods

The study included 95 patients; 15 of them newly diagnosed and untreated, and 80 patients with long-standing Crohn's disease. Serum sRANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , IL-6, osteocalcin and C-telopeptide I were measured by immunoassay. Bone status was evaluated, in parallel, by calcaneal quantitative ultrasound (QUS), and dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) scanned spine (L1-L4) and hip bone mineral density (BMD).

Results

Decreased BMD at diagnosis was found in 53% and low bone mass in 72% of the study population. The newly diagnosed, untreated patients showed correlation between TNF- α and sRANKL ($r=0.6$; $p=0.027$), and this positive relationship also persists in the unselected study population of long-standing CD patients ($n=80$) ($r=0.3$; $p=0.009$). Multiple regression identified TNF- α as the best predictor of sRANKL ($p<0.001$). Analysis of the OPG and sRANKL relationship according to subgroups showed absence of correlation in patients with healthy skeleton, and an inverse relationship in those with decreased BMD ($r=-0.36$; $p=0.003$). In naïve patients with reduced BMD $t\text{-score}\leq -1.0$, the correlation between sRANKL and OPG was highly inverse ($r=-0.8$; $p=0.02$) and

Abstract

these patients were characterized by lower BMI, significantly higher level of proinflammatory cytokines, elevated CRP and increased activity of free sRANKL and OPG.

The sensitivity of QUS to identify bone disease was 93%; indicating 7% of patients with verified bone disease to be misclassified as false negative. The specificity of 63% showed that 37% of individuals with normal bone status were QUS classified as false positive. The sensitivity of QUS to detect osteopenia was 84% and 72% for osteoporosis.

Conclusions

Bone disease that accompanies CD at diagnosis suggests that bone metabolism is affected by the underlying inflammatory process *per se*, as probably confirmed by our finding of the central proinflammatory cytokine TNF- α being strongly associated with the osteoclastogenic mediator RANKL, and inversely with bone density.

Calcaneal QUS showed poor agreement with bone status scanned by DXA and a low discriminatory power between osteopenia and osteoporosis. However, QUS successfully identified patients with previous fragile fractures.

Osobni podaci

Ime i prezime NIKŠA TURK
Datum i mjesto rođenja 16. rujna 1975. Zagreb

Podaci o školovanju

1981-1989 Osnovna škola, Zagreb
1989-1993 Matematička gimnazija, Zagreb
1993-2000 Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2001-2004 Doktorski poslijediplomski studij, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo

2001 Pripravnički staž
2001-2003 Znanstveni novak, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Merkur
2003 Specijalizacija iz interne medicine
2004 - Znanstveni novak, Zavod za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Rebro, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2007 Položen specijalistički ispit iz interne medicine

Stručno usavršavanje

2004 EKG u liječničkoj praksi, poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije, Zagreb
2004 Hitnosti u kliničkoj medicini, poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije, Zagreb
2005 European School of Gastroenterology, Como, Italija
2005 6th Summer School on Intensive Care Medicine, Brijuni, Hrvatska
2006 European Crohn's & Colitis Organisation - School on IBD for Junior Gastroenterologists, Amsterdam
2006 ASNEMGE-Young Investigator Workshop, Wien, 21-23. April, 2006
2006 Workshop on therapeutic endoscopy, Beograd, 21-22. November

Sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

2007- Znanstveni novak na projektu "Upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis)" MZOŠ projekt 108-1081874-1917; glavni istraživač prof dr B. Vucelić

Životopis i popis publikacija

- 2004 -2006 Znanstveni novak na projektu "Upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis)" MZOS-RH 0108294, glavni istraživač prof dr B. Vucelić
- 2002-2003 Kao znanstveni novak sudjelovao je u radu na projektu "Prognostički faktori, dijagnostika i terapija hemoblastoza" MZIT-RH 108107
- 1996-2001 Kao student sudjelovao je u radu na projektu "Glikozilacije proteina i patogeneza komplikacija dijabetesa" MZIT-RH 045003

Publikacije

11 radova objavljenih u CC indeksiranom časopisu
2 rada objavljen u časopisima s recenzijom
17 kongresnih priopćenja s međunarodnih skupova
13 kongresnih priopćenja s nacionalnih skupova
80 Citiranost radova

Članstva

Hrvatsko gastroenterološko društvo
Hrvatski liječnički zbor
Hrvatska liječnička komora

Radovi objavljeni u časopisima koje navodi Current Contents

1. Turk N, Čuković-Čavka S, Koršić M, Turk Z, Vucelić B. Proinflammatory cytokines and RANKL/Osteoprotegerin associated with bone deterioration in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;in press
2. Turk N, Kaštelan D, Čuković-Čavka S, Kraljević I, Koršić M, Vucelić B. Discriminatory ability of calcaneal quantitative ultrasound assessment of bone status in patients with inflammatory bowel disease. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:863-869.
3. Turk N, Kušec R, Jakšić B, Turk Z. Humoral SPARC/Osteonectin protein in plasma cell dyscrasias. *Ann Hematol* 2005;84:304-310.
4. Turk N, Mornar A, Mrzljak V, Turk Z. Urinary excretion of advanced glycation endproducts in patients with type 2 diabetes with various stages of proteinuria. *Diabetes Metab* 2004;30:187-192.
5. Turk Z, Šesto M, Skodlar J, Ferencak G, Pokupec R, Turk N, Stavljenić-Rukavina A. The products of advanced glycation in patients with type 2 diabetes and vascular disease. *Ann Clin Biochem* 2003;40:552-559
6. Pokupec R, Kalauz M, Turk N, Turk Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:378-384.
7. Turk Z, Šesto M, Skodlar J, Ferencak G, Turk N, Stavljenić-Rukavina A. Soluble LDL-Immune complexes in type 2 diabetes and vascular disease. *Horm. Metab. Res.* 2002;34:196-201.
8. Turk Z, Ljubić S, Turk N, Benko B. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2001;303:105-115.
9. Turk Z, Mrzljak V, Turk N, Metelko Ž. Changes of autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins during long-term LDL-apheresis. *Diab Nutr Metab* 1999;12: 413-417.
10. Turk Z, Mišur I, Turk N, Benko B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:813-820

11. Turk Z, Mišur I, Turk N. Temporal association between lens protein glycation and cataract development in diabetic rats. *Acta Diabetol.* 1997;34:49-54.

Radovi objavljeni u časopisima s recenzijom:

1. Turk N, Kušec R, Dominis M, Marušić-Vrsalović M, Jakšić B. Pojava B-kronične limfocitne leukemije u Hodgkinovoj bolesti: prikaz slučaja *Liječnički vjesnik* 2003;125:184-187.
2. Turk Z, Flego I, Kerum G, Turk N, Metelko Ž. Comparison of platelet activities in IDDM patients on conventional therapy and insulin pump treatment. *Diabet Croat* 1996;25:165-171.

Kongresna priopćenje s međunarodnih skupova

1. Turk N, Čuković-Čavka S, Koršić M, Turk Z, Vucelić B. Inflammation is the main determinant of bone loss in naïve patients with Crohn disease. *Gastroenterology* 2008;134(Suppl 1):A512-A512
Digestive Disease Week, May 17-22, 2008, San Diego, USA
2. Turk N, Čuković-Čavka S, Koršić M, Turk Z, Vucelić B. Biomarkers of inflammation and bone turnover associated with bone loss in naïve and long-standing patients with Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2008; 2 (suppl.1): 80-81.
3rd ECCO Congress Februar 28-March 1, 2008, Lyon, France
3. Turk N, Čuković-Čavka S, Koršić M, Turk Z, Vucelić B. Receptor activator of nuclear factor κB-ligand, its decoy receptor osteoprotegerin and proinflammatory cytokines associated bone decline in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(suppl 1): S385
IFCC-WordLab Congress, 28 september -2 october, 2008, Fortaleza, Brasil
4. Turk N, Čuković-Čavka S, Kaštelan D, Kardum I, Kraljević I, Hršić I, Krznarić Ž, Koršić M, Vucelić B. Soluble RANKL/Osteoprotegerin relationship to bone status in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2005;54(suppl VII):A156
5. Turk N, Čuković-Čavka S, Kaštelan D, Kardum I, Kraljević I, Hršić I, Krznarić Ž, Koršić M, Vucelić B. Soluble RANKL/Osteoprotegerin relationship to calcaneal quantitative ultrasonography in patients with inflammatory bowel disease. *Abstracts of FALK Symposium 147; Colitis:Diagnosis and therapeutic strategies* 2005;76.
6. Minigo H, Planinc-Peraica A, Kolonic SO, Kristo DR, Turk N, , Marić-Bešić K, Maglov C, Strauss-Patko M, Siftar Z, Kardum M, Kardum-Skelin I, Vrhovac R, Kusec R, Japce V, Jaksic O, Jaksic B. Mini-BEAM polychemotherapy plus G-CSF is superior to Cyclophosphamide alone plus G-CSF priming for peripheral blood stem cell collection for autologous stem cell transplantation in patients with malignant lymphomas. *Bone Marrow Transplantation* 2003; 31(Suppl. 1):S75-S76

7. Turk Z, Pokupec R, Kalauz M, Turk N. Advanced glycated and HMW-proteins in diabetic and nondiabetic cataractous lenses. *Diabetes* 2003; 52(suppl 1): A204
8. Turk Z, Šesto M, Turk N, Skodlar J, Ferenčak G, Stavljenić-Rukavina A. AGE containing immune complexes in diabetic and nondiabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes* 2003; 52(suppl 1): A169
9. Turk Z, Mornar A, Turk N, Mrzljak V. Advanced glycation endproducts in various stages of proteinuria. *Diabet & Metabolism* 2003;29:4S350
10. Minigo H, Planinc-Peraica A, Ostojić-Kolonić S, Radić-Kristo D, Turk N, Marić-Bešić K, Šiftar Z, Kardum M, Maglov C, Strauss-Patko I, Kardum-Skelin I, Kušec R, Jakšić O, Jakšić B. Cox multivariate analysis identifies age, CD34+ cells and time to WBC recovery as independent predictors of survival post autologous stem cell transplantation (ASCT) in 102 patients with relapsing or resistant malignant lymphomas (ML). *Bone Marrow Transplantation* 2002; 29(suppl 2):1
11. Turk Z, Šesto M, Skodlar J, Ferenčak G, Turk N, Stavljenić-Rukavina A. Products of advanced glycation in diabetes and vascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:(suppl):99.
12. Turk Z, Ljubić S, Turk N, Benko B. Serum Antibodies to Advanced Glycation Endproducts (AGE) and Circulating AGE-Immune Complexes in NIDDM Patients. *Diab Res Clin Pract* 2000; 50(suppl 1): S357
13. Turk N, Mrzljak V, Turk Z, Metelko Ž. Effect of LDL-apheresis therapy on antibodies against oxidized LDL. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: S276
14. Turk Z, Mišur I, Turk N, Benko B. Collagen-linked advanced glycation endproducts in relation to glycemic control and duration of diabetes. *Diabetes* 1999;48 (suppl 1): A136
15. Turk Z, Mrzljak V, Turk N, Metelko Ž. Antioxidized LDL autoantibodies during long-term apheresis. *Abstracts of 70th European atherosclerosis society (EAS) congress* 1998;42.
16. Turk Z., Flego I., Turk N, Kerum G. Platelet function and thromboxane formation during continuous insulin infusion in type 1 diabetes. *Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry*, 1996;368

Kongresna priopćenje s skupova u zemlji

1. Turk N, Kaštelan D, Čuković-Čavka S, Kraljević I, Kardum I, Koršić M, Vucelić B. Low discriminatory ability of calcaneal quantitative ultrasound assessment of bone status in patients with inflammatory bowel disease. 4. Kongres Hrvatskog gastroenterološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 22-25.ožujka, 2006; Knjiga sažetaka 2006, str 15
2. Perković Z, Erdeljić V, Jelčić J, Željковиć-Vrkić T, Turk N, Dušek T. Mikonazol gel i pojačanje antikoagulantnog učinka varfarina (prikaz slučaja) *Liječnički vjesnik* 2004;126 (suppl 3): 52. Treći hrvatski internistički kongres, Opatija, 7-10. listopada 2004

3. Letilović T, Kušec R, Turk N, Kardum-Skelin I, Minigo H, Planinc-Peraica A, Ostoić S, Vrhovac R, Gašparov S, Jaksic B. Multipli mijelom: osteolitičko-osteoklastička koštana bolest (prikaz slučaja). *Liječnički vjesnik* 2003; 125(supl 3): 111. Treći hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Opatija 23-26 listopada 2003
4. Minigo H, Vrhovac R, Planinc-Peraica A, Kolonic-Ostoić S, Radić-Krišto D, Turk N, Marić-Bešić K, Maglov C, Strauss-Patko M, Siftar Z, Kardum M, Kardum-Skelin I, Kusec R, Jaksic O, Jaksic B. Mini-BEAM IgG CSF učinkovit protokol za sakupljanje perifernih matičnih stanica (PMS) u bolesnika s malignim limfomima. *Liječnički vjesnik* 2003; 125(supl 3): 151. Treći hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Opatija 23-26 listopada 2003
5. Turk Z, Šesto M, Skodlar J, Ferencak G, Turk N, Stavljenić-Rukavina A. Humoralni gliko-oksidijski produkti u bolesti koronarnih arterija. *Liječnički vjesnik* 2003; 125(supl 1): 69
Četvrti hrvatski kongres o aterosklerozi, Dubrovnik, 14-17 svibanj 2003
6. Turk N, Kušec R, Kardum-Skelin I, Dominis M, Marušić-Vrsalović M, Planinc-Peraica A, Ostojić-Kolonić S, Minigo H, Barišin A, Pavliša G, Jakšić B. Pojava B-kronične limfocitne leukemije u Hodgkinovoj bolesti: prikaz slučaja. *Liječnički vjesnik* 2002;124(supl 3):92
7. Pavliša G, Planinc-Peraica A, Ostojić-Kolonić S, Kušec R, Kardum-Skelin I, Turk N, Kardum M, Jakšić B. Progredijentna hipergamaglobulinemija u tijeku B-kronične limfocitne leukemije (B-KLL). *Liječnički vjesnik* 2002;124(supl 3):76.
8. Turk Z, Ljubić S, Turk N, Benko B. Glikozilirani proteini i njihova autoantitijela. *Liječnički vjesnik* 2001; 123(supl 1): 59.
9. Turk Z, Ljubić S, Turk N, Benko B. Autoantitijela na glikozilirane proteine u šećernoj bolesti. *Liječnički vjesnik* 2001; 123(supl 2): 74.
10. Turk Z, Turk N, Benko B. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes. 25 kongres hrvatskih biokemičara i molekularnih biologa, Zagreb, 13-15.10.2000. Knjiga sažetaka 2000, str 103.
11. Mrzljak V, Turk Z, Turk N, Metelko Ž. Autoantitijela na oksidirani LDL tijekom dugotrajne LDL-afereze. *Liječnički vjesnik* 1999;121(supl 1):53.
12. Turk Z, Flego I, Kerum G, Turk N, Metelko Ž. Učinak intenzivirane terapije inzulinom na aktivnost trombocita u šećernoj bolesti. *Liječnički vjesnik* 1997; 119(supl 2):57
13. Turk Z, Flego I, Kerum G, Turk N, Metelko Ž. Agregacija trombocita i sinteza tromboksana tijekom liječenja inzulinskom pumpom. *Liječnički vjesnik* 1997; 119(supl 1):56

Pozvana predavanja

Krznaric Z, Turk N, Liberati Cizmek AM, Cukovic-Cavka S: Colorectal cancer in inflammatory bowel diseases. 5th Central Europe Gastroenterology Meeting, Bratislava, June 26-28, 2008.