

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedrana Makević

BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE,
IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA I
DIGITALNA ANALIZA SLIKA
PATOHIŠTOLOŠKIH PREPARATA UZORAKA
CREVA DECE SA ZAPALJENSKIM BOLESTIMA
CREVA

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Vedrana Makević

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS,
IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS, AND
DIGITAL IMAGE ANALYSIS OF
PATHOHISTOLOGICAL INTESTINAL
SPECIMENS FROM CHILDREN WITH
INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Silvio de Luka, redovni profesor
Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor doktorske disertacije:

dr Anđelija Ilić, viši naučni saradnik
Institut za fiziku Beograd, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Zoran Bukumirić, vanredni profesor,
Institut za medicinsku statistiku i informatiku, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Bojan Jorgačević, docent
Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Sanjin Kovačević, docent
Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Predrag Kolarž, naučni savetnik
Institut za fiziku Beograd, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Zvezdan Milanović, redovni profesor
Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini
sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Datum odbrane:

Mojim najdražima

Zahvaljujem se koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:

- 1. Kreiranju koncepta teze: prof. dr Silvio de Luka ,dr Anđelija Ilić, VNS, asist.dr Ivan Milovanović;*
- 2. Prikupljanju podataka: dr Nevena Popovac, asist.dr Ivan Milovanović;*
- 3. Formalnoj analizi: istraživač – pripravnik MSc Jelena Trajković, MSc Bojana Milošević, asist.dr. Jovan Jevtić, asist.dr Andrija Vuković, dr Saša Janković, VNS, dr Vesna Janković, VNS, dr Srđan Stefanović, VNS, prof.dr Radmila Janković;*
- 4. Metodologiji: dr Anđelija Ilić, VNS, dr Saša Janković, VNS;*
- 5. Statističkoj analizi: prof. dr Zoran Bukumirić;*
- 6. Superviziji: prof. dr Silvio de Luka, dr Anđelija Ilić, VNS;*
- 7. Pisanju – originalni nacrt: dr Anđelija Ilić, VNS;*
- 8. Pisanju – recenzija i uređivanje: prof. dr Silvio de Luka ,dr Anđelija Ilić, VNS, asist.dr Ivan Milovanović, prof.dr Radmila Janković.*

BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE, IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA I DIGITALNA ANALIZA SLIKA PTOHISTOLOŠKIH PREPARATA UZORAKA CREVA DECE SA ZAPALJENSKIM BOLESTIMA CREVA

Sažetak

Zapaljenske bolesti creva grupa su hroničnih zapaljenskih poremećaja gastrointestinalnog trakta koju čine Kronova bolest, ulcerozni kolitis UK i neklasifikovani IBD. U četvrtini slučajeva bolest se javlja pre 20-te godine.

Ciljevi ovog istraživanja bili su da se u grupama dece obolele od KB i UK i kontrolnoj grupi odrede: vrednosti standardnih hematoloških i biohemijskih parametara u krvi, koncentracija elemenata u serumu i tkivu creva, morfometrijska, fraktalna i GLCM teksturalna analiza digitalizovanih mikrografa creva i ekspresija parametara oksidativnog stresa 4-HNE u tkivu creva. U studiji preseka učestvovalo je 20 dece obolele od KB, 18 dece obolele od UK i 20 kontrola.

Ukupni holesterol je bio niži kod obolelih od UK i KB, a HDL holesterol samo kod obolelih od KB u odnosu na kontrolnu grupu. Kreatin kinaza značajno se razlikovala među ispitivanim grupama. Pokazali smo da je u serumu ispitivane dece gvožđe bilo značajno niže kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole, dok je Mn u serumu bio niži kod obolelih od KB u odnosu na obolele od UK. Nadalje, u nekim segmentima creva Mg je bio niži u IBD nego u kontrolnoj grupi. Naši rezultati pokazuju i da su u tankom crevu bakar, mangan i cink bili značajno niži kod dece obolele od IBD u odnosu na kontrole, a Mn i kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole.

Morfometrijska ispitivanja pokazala su da je po veličini crevnih jedara moguće izdvojiti obolele od UK od drugih ispitivanih grupa, a na osnovu njihove cirkularnosti obolele od KB od kontrole. Osim toga, deca obolela od UK imala su statistički značajno višu fraktalnu dimenziju i nižu lakunarnost hromatina ćelijskih jedara debelog creva u odnosu na obolele od KB i kontrole. GLCM teksturalna analiza jedara završnog dela tankog creva pokazala je razliku između jedara obolelih od UK i jedara drugih ispitivanih grupa. Uz par izuzetaka isto je pokazano i u sigmoidnom kolonu. Rektum i ascendentni kolon bili su značajni segmenti za razlikovanje obolelih od KB od kontrolne grupe. Obim ekspresije 4-HNE u epitelnim ćelijama creva obolelih od KB korelirao je sa GLCM teksturalnim parametrima.

Ključne reči: Zapaljenske bolesti creva, Kronova bolest, ulcerozni colitis, oligoelementi, morfometrijska analiza, fraktalna analiza, GLCM analiza, 4-HNE

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj:

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS, IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS, AND DIGITAL IMAGE ANALYSIS OF PATHOHISTOLOGICAL INTESTINAL SPECIMENS FROM CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), encompassing Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), and unclassified IBD is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. In a quarter of cases, the disease occurs before the age of 20.

This research aimed to determine: the values of standard hematological and biochemical parameters in the blood, the concentration of elements in serum and intestinal tissue, morphometric, fractal, and GLCM textural analysis of digitized micrographs of the intestine, and the expression of oxidative parameters of stress 4 Hydroxynonenal (4-HNE) in intestinal tissue in the groups of children suffering from CD and UC and the control group. In this cross-sectional study, we included 20 children with CD, 18 children with UC, and 20 controls.

Total cholesterol was lower in patients with UC and CD, and HDL cholesterol only in those with CD compared to the control group. Creatine kinase was significantly different between the investigated groups. The study shows that serum iron was significantly lower in children suffering from CD compared to controls, while serum Mn was lower in children with CD compared to the ones with UC. Furthermore, in some intestinal segments, Mg was lower in IBD than in the control group. Our results also show copper, manganese, and zinc in the small intestine to be significantly lower in children with IBD compared to controls, and Mn in children with CD compared to controls.

Morphometric analysis revealed that according to the size of the intestinal nuclei, it is possible to separate patients with UC from other investigated groups. In addition, based on nuclear circularity, patients with CD can be distinguished from controls. Further, children with UC had a statistically significantly higher fractal dimension and lower lacunarity of colon cell nuclei compared to the children with CD and controls. GLCM textural analysis of the terminal ileum nuclei showed a difference between the nuclei of UC patients and other investigated groups. With a few exceptions, the same is shown in the sigmoid colon. The rectum and ascending colon were significant segments for distinguishing patients with CD from the control group. The extent of 4-HNE expression in intestinal epithelial cells of CD patients correlated with GLCM textural parameters.

Key words: Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, ulcerative colitis, trace elements, morphometric analysis, fractal analysis, GLCM analysis, 4-HNE

Scientific area: Medicine

Narrow scientific field: Physiological sciences

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kronova bolest.....	1
1.2. Ulcerozni kolitis.....	2
1.3. Pedijatrijski IBD.....	3
1.4. Epidemiologija.....	4
1.5. Etiologija i patogeneza.....	5
1.6. Značaj genetske podložnosti u nastanku IBD.....	5
1.7 Uloga mikrobioma u nastanku IBD.....	7
1.8. Uloga faktora sredine u nastanku IBD – „Ekspozom“.....	10
1.9. Uloga imunoloških faktora u nastanku IBD.....	12
1.9.1. Poremećaji urođenog imuniteta.....	12
1.9.2. Poremećaji stečenog imuniteta.....	13
1.10. Uloga slobodnih kiseoničnih vrsta u patogenezi IBD.....	14
1.11. Oligoelementi u patogenezi IBD.....	14
1.12. Morfometrija, fraktalna i GLCM teksturalna analiza.....	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJAL I METODE.....	18
3.1. Studijski pacijenti.....	18
3.2. Protokol istraživanja.....	18
3.3. Metode.....	19
3.3.1. Određivanje hematoloških i biohemijskih parametara.....	19
3.3.2. Endoskopija.....	20
3.3.3. Patohistološka analiza.....	20
3.3.4. Imunohistohemijska analiza.....	20
3.3.5. Određivanje koncentracije mikro- i makroelemenata.....	20
3.3.5.1. Potvrda kvaliteta.....	21
3.3.6. Priprema medicinskih slika za dalje analize.....	22
3.3.7. Morfometrijska analiza mikrografija.....	22
3.3.8. Izdvajanje teksture hromatina segment. lokalnim postavljanjem praga.....	23
3.3.9. Fraktalna analiza mikrografija.....	24
3.3.10. GLCM analiza mikrografija.....	24
3.4. Statistička analiza.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Klinički, hematološki i biohemijski parametri.....	26
4.2. Mikro- i makroelementi.....	29
4.3. Morfometrijski, fraktalni i GLCM teksturalni parametri.....	40
4.4 Imunohistohemijska analiza oksidativnog stresa u tkivu.....	57
5. DISKUSIJA.....	58
6. ZAKLJUČCI.....	74
7. LITERATURA.....	76

1. UVOD

Zapaljenske bolesti creva (*Inflammatory bowel disease* - IBD) grupa su hroničnih zapaljenskih poremećaja gastrointestinalnog trakta koju čine Kronova bolest (KB), ulcerozni kolitis (UK) i neklasifikovani IBD (*IBD unclassified* – IBD-U) (1). KB je bolest celokupnog gastrointestinalnog trakta, te može zahvatiti bilo koji njegov deo od usta, pa sve do anusa. U ovoj bolesti zapaljenje je transmuralno (2). Ovako duboko zahvatanje creva ume da bude praćeno komplikacijama u vidu fistula i sledstvenih apscesa u abdomenu ili perianalnoj regiji. Za KB tipični su izvijugane i aftozne ulceracije, dok patognomonično obeležje ove bolesti predstavljaju nekazeozni epitelioidni granulomi, mada treba naglasiti da njihovo prisustvo nije neophodno za dijagnozu bolesti. Zahvatanje perianalne regije (npr. fisure, fistule, apscesi), takođe, je karakteristično samo za KB (3). S druge strane UK je bolest ograničena na debelo crevo koja podrazumeva samo površno, ali kontinuirano zahvatanje njegove sluznice počevši od rektuma. (2). Kod većine pacijenata (46%) bolest se zadržava u rektumu i sigmi (proktitis i proktosigmoiditis), a kada je ekstenzivnija onda zahvata i distalni deo creva (kod 17% obolelih), dok je pankolitis, stanje u kome zapaljenje napreduje preko spleničke fisure creva prisutno u 37% obolelih (4). Dakle, za razliku od KB, ova bolest ne zahvata tanko crevo, osim izuzetno u slučajevima nespecifičnog zapaljenja terminalnog dela ileuma u UK pacijenata sa zahvaćenošću čitavog debelog creva nazvanog *backwash ileitis*. Kod obolelih sa dijagnozom *IBD – U (IBD unspecified)* zahvaćen je samo kolon, a ni druge karakteristike bolesti kod ovih pacijenata nisu specifične ni za KB ni za UK (3).

Klasični simptomi IBD su dijareja, rektalno krvarenje, povremena mučnina i povraćanje, bol u stomaku ili osetljivost na palpaciju. Oni su posledica crevnog oštećenja usled preteranog zapaljenskog procesa. Ova bolest može se komplikovati malnutricijom, anemijom, opstrukcijom i fistulama creva i infekcijama. Osim toga, kod ovih pacijenata povećan je i rizik od karcinoma creva. Nadalje, mogu biti prisutni simptomi od strane drugih organskih sistema: bolovi i zapaljenja zglobova, ankilozirajući spondilitis, osipi i bolesti kože poput psorijaze, eritema nodozum i dr, oboljenja žučnih puteva (primarni sklerozirajući holangitis) i očiju (uveitis) (5).

1.1. Kronova bolest

Kod ove bolesti relapsno remitentnog toka bilo koji deo GIT-a može biti zahvaćen. Polovina pacijenata ima zahvaćen ileum tankog creva i debelo crevo, dok bolest zahvata samo ileum ili samo debelo crevo u četvrtini slučajeva. Analna regija zahvaćena je kod trećine pacijenata, a oralna i gastroduodenalna lokalizacija bolesti prisutna je u 5-15 procenata obolelih. U aktivnoj fazi bolesti najčešći simptom je dijareja. Smanjena apsorpcija vode, a povećana elektrolita glavni je uzrok, a ostali uzroci dijareje su preterani rast bakterija u tankom crevu (uglavnom kod opstrukcije) i dijareja uzrokovana žučnim kiselinama (zbog disekcije ili resekcije creva). Simptomi mogu varirati u odnosu na zahvaćenost GIT. Kod ileokolitisa simptomi liče na apendicitis: bol u desnom donjem kvadrantu abdomena, temperatura i dijareja. Malapsorpcija i steatoreja javljaju se kod ekstenzivne bolesti. Usled zapaljenja može se javiti blago povišena temperatura, a više vrednosti prisutne su kod apscesa ili infekcija u abdomenu. Gubitak težine (10-20%) često nastaje usled smanjenog unošenja hrane i malapsorpcije. Bolest je neretko praćena pojavom unutrašnjih (entero-enteralna, entero-vezikalna) ili spoljnih fistula. Zapravo je pokazano da će osobe sa inflamatornim fenotipom na početku bolesti u narednih 20 godina razviti komplikacije ili u vidu striktura ili u vidu fistula. Od vancrevnih komplikacija uglavnom se javljaju upale zglobova, oboljenja kože (pioderma gangrenozum, eritema nodozum) i očiju (uveitis, iritis). Bolest se uglavnom klasifikuje prema Montrealskoj klasifikaciji koja uključuje godine, lokalizaciju i ponašanje bolesti (prisustvo/odsustvo striktura, fistula, perianalna bolest) (6).

U dijagnostici ove bolesti radiografskim, endoskopskim i patološkim metodama treba pokazati njene glavne karakteristike: fokalno, asimetrično zahvatanje GIT, transmuralnu zahvaćenost ili granulomatozno zapaljenje. Laboratorijski nalaz uglavnom pokazuje anemiju (deficit gvožđa, hronična bolest, deficit vitamina B12). Od markera zapaljenja značajni su brzina sedimentacije i CRP. CRP se koristi za praćenje odgovora na terapiju, predviđanje toka bolesti i klasifikovanje pacijenata (6). Kod bolesti koja zahvata i tanko crevo moguća je hipoalbuminemija i deficiti vitamina (7). Kalprotektin i laktoferin biomarkeri poreklom iz neutrofila koji se detektuju u stolici tokom zapaljenja odlično koreliraju sa endoskopskom aktivnošću KB. Oni se koriste za praćenje aktivnosti bolesti, odgovora na terapiju, čak i za predviđanje relapsa (6). Kalprotektin ima visoku senzitivnost i specifičnost kada je dijagnoza IBD u pitanju (7). Serološke analize koje mogu pomoći u postavljanju dijagnoze KB su antitela protiv *saccharomyces cerevisiae* (*antibodies against saccharomyces cerevisiae* - ASCA) i druga. Endoskopija služi za potvrdu dijagnoze, definisanje lokalizacije bolesti i uzimanje uzoraka za patohistološku analizu. U početku bolesti ne moraju se detektovati promene ili su prisutni aftozni ulkusi (posledica ekspanzije limfoidnog folikula u submukozi). Kad je bolest srednje izražena ovi ulkusi se slivaju i formiraju veće ulkuse, koji mogu podsećati na zvezdu (stelatni ulkusi). Kod još intenzivnije bolesti javlja se kaldrmast izgled (*cobble-stoning*) mukoze. Najteže forme praćene su velikim linearnim i dubokim izvijuganim ulceracijama (6). Endoskopski indeksi, najpoznatiji Indeks ozbiljnosti KB (Crohn's Disease Index of Severity - CDEIS), jednostavni endoskopski skor za KB (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease - SES-CD) i Rutgertov skor, postali su zlatni standard za procenu aktivnosti KB. Indeks aktivnosti KB (Crohn's Disease Activity Index - CDAI) koriste kliničke studije u cilju pokazivanja remisije i odgovora na terapiju. Na remisiju ukazuje njegova vrednost ispod 150, a na ozbiljnu bolest preko 450. Njegova jednostavnija verzija je Harvi Bradšo (Harvey Bradshaw index - HBI) (6). Međutim, kod jedne trećine pacijenata postoji zapaljenje koje se patohistološki može potvrditi, iako endoskopski sluznica izgleda zaceljena (8). Radiografske metode (kontrastna radiografija, kompjuterizovana tomografija i magnetna rezonanca) koriste se za identifikovanje crevnih komplikacija i potvrdu lokalizacije bolesti. Endoskopija bežičnom video kapsulom (Wireless video capsule endoscopy -VCE) korisna je u evaluaciji promena na tankom crevu kod KB. Histološki na KB ukazuje fokalni, diskontinuirani, hronični i transmuralni zapaljenski infiltrat uz očuvane peharaste ćelije. Čest nalaz su metaplazija piloričnih žlezda i transmuralna limfoidna agregacija. Glavni histološki znak KB, epiteloidni granulom, viđa se u samo 15% biopsija mukoze, ali u 70% hiruških biopsija (7). Globalni skor histološke aktivnosti (*Global Histology Activity Score – GHAS*) omogućava skorovanje histoloških abnormalnosti kod KB (9). Histološka aktivnost bolesti koristi se za procenu rizika od neoplazije, a postoji sve veći interes da se histološko zaceljenje koristi kao pokazatelj efekta terapije i postizanja remisije i kod KB, ali i UK (10).

Tretmanom KB treba zaustaviti progresiju bolesti koja vodi u oštećenje creva, komplikacije i invaliditet. Cilj terapije KB je endoskopska i klinička remisija (duboka remisija). U terapiji se koriste kortikosteroidi, imunosupresivi i biološke supstance (anti TNFalfa antitela) i antiadhezioni molekuli. Kod ozbiljne KB koristi se terapijski sistem od vrha na dole (7).

1.2. Ulcerozni kolitis

U kliničkom smislu UK odlikuju hroničan bol u stomaku i krvavi prolivi. Tipičan je bol u abdomenu tokom i oko perioda defekacije. Od vancrevnih komplikacija najčešće se javljaju upale zglobova i primarni sklerozirajući holangitis, prisutan u 2-10% bolesnika. Osnova za postavljanje dijagnoze UK je prisustvo krvave dijareje uz negativnu kulturu stolice, endoskopski pokazano difuzno, neprekidno zapaljenje sluznice koje zahvata rektum,

a može se proširiti i do proksimalnijih delova debelog creva. Simptomi koji jasno ukazuju na KB su lezije na preskok, granulomi, zahvatanje gornjeg dela gastrointestinalnog trakta (GIT) i prisustvo fistula u analnoj regiji. Patohistološki nalaz karakterističan za UK je difuzna infiltracija mukoze zapaljenskim ćelijama sa bazalnom plazmocitozom, poremećaji arhitektonike kripti i smanjenje broja peharastih ćelija. Laboratorijski nalaz nije specifičan i sugerise zapaljenje (CRP i sedimentacija) i posledice nutritivnih deficita (deficit gvožđa, anemija). Od seroloških markera za UK najznačajniji su perinuklearna (p) i atipična(x) antineutrofilna-citoplazmatska antitela (ANCA) koja postoje kod 50-70% obolelih i antitela na peharaste ćelije (*anti-goblet cell antibodies* - GAB) prisutne u manjem procentu (15-28%). Za klasifikaciju i prognozu UK koriste se različiti skorovi: modifikovani Truelov, Vitov indeks ozbiljnosti i *Mayo* skor (11). Validirani indeksi za patohistološko skorovanje UK su *Geboes* skor, Robertov histopatološki indeks (*Robarts Histopathology Index* - RHI) i *Nancy* indeks (12). Za uspostavljanje remisije i njeno održavanje koriste se oralni aminosalicilati. Ukoliko bolest ne reaguje potrebno je uvesti pronizon ili neki njegov analog. Imunosupresivi su terapija održavanja kod osoba sa hroničnim UK ili UK koji ne reaguje na steroidnu terapiju. Ukoliko pacijent ne reaguje na standardnu terapiju ili je bolest pod kontrolom samo ako se steroidi stalno koriste, može se razmisliti o uvođenju biološke terapije (anti TNF-alfa antitela). I pored dostupnog širokog spektra medikamentozne terapije, bolest nekada zahteva hirurško uklanjanje debelog creva (totalna proktokolektomija sa ilealni pauč – analnom anastomozom) (11).

1.3. Pedijatrijski IBD

Kod dece IBD obično daje ekstenzivniju bolest (u pogledu zahvaćenosti digestivnog trakta) u odnosu na odrasle i bolest je uopšte agresivnija. Primera radi, prema jednoj studiji pankolitis kod UK pacijenata je imao incidenciju od neverovatnih 90%, dok je ovaj procenat u istoj bolesti odraslih iznosio 37%. Osim toga, verovatnoća da će detetu sa IBD biti potrebna operacija u prvih 5 godina nakon dijagnoze iznosi 34%. Deca obolela veoma rano, pre šeste godine života, imaju formu IBD sa veoma ranim početkom (*Very Early Onset IBD* - VEOIBD) dok je infantilni IBD karakterističan za decu obolelu pre druge godine života (13). Jedan procenat dece ima KB praćenu strikturama već u trenutku kada je dijagnoza postavljena, ali većina dece ipak ima samo zapaljenje koje se vremenom razvija u bolest komplikovanu strikturama (3). Dijareja, bol u stomaku, sveža krv u stolici i anemija su neki od klasičnih simptoma IBD i u dečijem uzrastu, ali u ovoj populaciji česte su i sistemske manifestacije poput zastoja u rastu i zakasnelog puberteta, anoreksije i gubitka težine, bolnih zglobova i promena na koži, anksioznosti i depresije (13). Naime, jedna od glavnih razlika u prezentaciji između adultnog i pedijatrijskog IBD je uticaj bolesti na rast i razvoj. Zapravo zaostajanje u rastu i zakasneli pubertet se mnogo više odnose na KB nego na UK. Uzrok zaostajanja u rastu može biti zapaljenje koje dovodi do rezistencije receptora za hormon rasta, ali i mala kalorijska vrednost ishrane obolele dece. Pravovremena (pre završetka puberteta) dijagnostika i terapija kod dece neophodne su zarad postizanja odgovarajuće visine u odraslom dobu. Zakasneli pubertet praćen je smanjenom mineralizacijom kostiju i vodi u pomenuti zastoj u rastu, a detetu može ostaviti i psihološke posledice (3).

Kada je dijagnostika u pitanju prvo je potrebno uraditi detaljnu evaluaciju rasta deteta na osnovu grafikona rasta svetske zdravstvene organizacije (SZO) svakom pacijentu kod koga postoji sumnja na IBD (3). Fizikalnim pregledom proverava se da li je stomak mek, da li su prisutni znaci peritonitisa, i ima li palpabilnih masa koje bi bile posledica striktura ili penetracija. Takođe, neophodan je pregled perianalne regije i rektuma (identifikacija fistula, apscesa itd.). Treba proveriti i da li u usnom delu ždrelo postoje ulceracije, pregledati zglobove (tražiti znake kao što su crvenilo, otok, ograničeni pokreti kičme), dok se pregledom kože prvenstveno donjih ekstremiteta mogu pronaći promene kao što su eritema

nodozum i pioderma gangrenozum (3). Da bi se postavila dijagnoza IBD u ovom uzrastu neophodno je prvo isključiti infektivne bolesti creva. Kompletna krvna slika, markeri zapaljenja, fekalni kalprotektin, albumini, transaminaze i gama glutamil transferaza (GGT) su podrazumevane analize (13). Kod nekih pacijenata prisutni su imunološki markeri: ASCA i pANCA, ali ih njihova visoka cena i mala prediktivna vrednost čine manje korisnim u odnosu na senzitivnije markere inflamacije (3). U sledećoj fazi rade se endoskopske analize – ileokolonoskopija i ezofagogastroduodenoskopija sa detaljnim opisom izgleda mukoze uz uzimanje većeg broja biopsija za patohistološku analizu. U cilju procene prisutnosti bolesti u tankom crevu kod većine pacijenata potrebno je uraditi enterografiju magnetnom rezonancijom. Za evaluaciju ovog dela creva nekada se radi endoskopija pomoću bežične kapsule. Ultrazvuk je standard u dijagnostici pedijatrijskog apendicitisa, a koristan je i za vizualizaciju terminalnog ileuma u cilju skrininga na KB. Na ovu bolest ukazuje hiperemija, zadebljanje ovog dela creva i mezenterijuma, uvećani limfni čvorovi i gubitak stratifikacije.

Pedijatrijski IBD obuhvata KB, UK i neklasifikovani IBD (IBD kolona čije su karakteristike takve da u trenutku dijagnoze nije moguće razlikovati UK i KB), a revidirani Porto kriterijumi iz 2014. godine uvode dve forme pedijatrijskog UK: tipični i atipični (14). Nadalje, dečiji IBD je klasifikovan prema Pariskoj modifikaciji Montrealske klasifikacije prema kriterijumima koji za KB uključuju uzrast deteta, lokalizaciju bolesti u digestivnom traktu, ponašanje bolesti (prisustvo striktura i penetracija) uz naznaku ako je prisutna perianalna bolest i zastoj u rastu. Ovi kriterijumi kod UK osim uzrasta deteta uzimaju u obzir ekstenzivnost kolitisa i ozbiljnost bolesti (13).

Pedijatrijski indeks aktivnosti ulceroznog kolitisa (*Pediatric ulcerative colitis activity index* – PUCAI) i *Mayo* skorovi daju nam glavne informacije o aktivnosti pedijatrijskog UK. PUCAI skor meri aktivnosti UK kod dece i njegov skor iznosi između 0 i 85. *Mayo* skor je još jedno od glavnih merila u proceni ozbiljnosti UK (15).

Klinička aktivnost pedijatrijske KB procenjuje se na osnovu pedijatrijskog indeksa aktivnosti KB (*Pediatric Crohn's disease activity index* – PCDAI). Na osnovu ovog indeksa oboleli se dele u četiri grupe: klinička remisija (0–10 poena), blaga bolest (11–25 poena), umerena bolest (26–50 poena) i ozbiljna bolest (>50 poena) (16).

Specifičnost u terapiji kada je dečija KB u pitanju je da isključivo enteralna ishrana predstavlja prvu liniju terapije za postizanje remisije u ovom uzrastu (7).

1.4. Epidemiologija

Procena je da od IBD boluje 2.2 miliona Evropljana, 1.5 miliona Amerikanaca i još nekoliko stotina hiljada ljudi na drugim kontinentima. Godišnja incidencija KB u Evropi je između 0.3 – 12.7 na 100 000 stanovnika, a u Severnoj Americi između 0 – 20.2 na 100000 stanovnika. Slična je i incidencija UK sa 0.6 – 24.3 slučajeva godišnje na 100000 stanovnika u Evropi i 0 – 19.2 na 100000 stanovnika u Americi (17). Bolest se uglavnom javlja kod mladih odraslih osoba premda se može javiti u bilo kojoj starosnoj grupi. U četvrtini slučajeva bolest se javlja pre 20-te godine (1), od čega su većina pedijatrijski slučajevi (18). Pedijatrijski slučajevi ove bolesti najčešće se javljaju u periodu adolescencije, ali petina dece ispolji prve simptome pre desete, a oko 5% njih pre pete godine života (1). U dečijem uzrastu ima više slučajeva KB u odnosu na UK, uz veću učestalost kod dečaka u odnosu na devojčice (1.8:1) (13). U poslednje vreme u većem delu sveta dolazi do porasta incidencije kako IBD odraslih, tako i pedijatrijske varijante ove bolesti. U nekim regijama gde postoji visoka prevalencija IBD (adultnog i pedijatrijskog) već duže vreme dolazi i do porasta incidencije VEOIBD (1). VEOIBD ima incidenciju od oko 4 na 100000 stanovnika (13).

Kada je prvi put prepoznata, krajem 18-og veka IBD je bila karakteristična samo za zemlje zapadne Evrope i Severne Amerike. Od osvita industrijske revolucije, pa do početka dvadesetog veka UK postaje već dobro poznata bolest, dok se tridesetih godina dvadesetog veka KB izdvaja kao poseban entitet. Sredina dvadesetog veka donosi izrazit skok u incidenciji IBD u industrijalizovanim zemljama Severne Amerike i zapadne Evrope i ovakav trend se nastavlja do kraja dvadesetog veka. U poslednje vreme studije govore da su ove zemlje stabilizovale IBD incidenciju, dok je incidencija pedijatrijskog IBD nastavila da raste (1) (prema studiji sprovedenoj u Kanadi sa 9.5 na 100000 1994. godine na 11.4 na 100000 2005.) (18). Kraj dvadesetog veka doneo je porast incidencije u zemljama u kojima je industrijalizacija tada tek počela da se razvija kao što su zemlje Azije, Afrike i Južne Amerike. Porast incidencije IBD u nekoj zemlji uglavnom počinje porastom broja slučajeva UK, a zatim ga KB sustiže i prestiže (1). Takođe, porast incidencije veći je u urbanim nego u ruralnim područjima. Naime, seosko stanovništvo kaska za gradskim za jednu deceniju (17).

1.5. Etiologija i patogeneza

IBD nastaje kao posledica interakcije genetskih, sredinskih i mikrobnih uticaja, pri čemu je svaki od ovih faktora neophodan, ali samostalno nije dovoljan za nastanak bolesti. Primera radi, osoba koja poseduje genetsku varijantu koja je čini podložnom bolesti ne mora nužno razviti bolest. Osim toga, porast incidencija IBD u industrijalizovanim zemljama tokom poslednjeg veka bio je suviše brz da bi bio posledica genetskih promena i prirodne selekcije. Naprotiv, mnogo je verovatnije da je ovaj porast uzrokovan promenama socijalnih normi, promenama u načinu života, načinu ishrane i životne sredine. Ove promene uzrokovane ljudskim faktorom verovatno uzrokuju ili barem doprinose nastanku bolesti kod osoba koje su joj genetski sklone (19).

1.6. Značaj genetske podložnosti u nastanku IBD

Na ulogu genetike u patogenezi IBD prvobitno je ukazala veća prevalencija ove bolesti u porodicama u kojima postoji oboleli član u odnosu na opštu populaciju (2-15%). Zapravo, postojanje srodnika obolelog od IBD, danas je najjači faktor rizika za razvoj Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Nadalje, značaj nasleđa u nastanku bolesti izučavale su studije sprovedene na blizancima koje su pokazale konkordanciju KB kod jednojajčanih blizanaca od 20 do 50% (20), dok je konkordancija kod UK bila niža. Osim toga, konkordancija postoji i u kliničkoj prezentaciji bolesti (21). Savremene genetske studije, u prvom redu studije asocijacije čitavog genoma (genome-wide association study - GWAS), otkrile su 242 genska lokusa povezana sa rizikom od IBD. Međutim, samo je za manjinu, 45 genskih lokusa, pronađena i genska varijanta koja uzrokuje bolest. Ove studije pokazale su povezanost gena koji imaju ulogu u prepoznavanju mikroorganizma, autofagiji, funkciji epitelne barijere i humoralnom i stečenom imunitetu, metabolizmu i dr. sa IBD (22). Zanimljivo da je većina pronađenih genetskih lokusa povezana sa obe bolesti, a KB i UK mnoge lokuse podložnosti dele i sa drugim bolestima u čiju je patogenezu uključen imunitet (23). Osim toga za 50 gena pokazano je da mogu uzrokovati monogenetske varijante IBD koje se javljaju u sklopu VEOIBD. Primeri su geni IL10R i XIAP (23). Iako su GWAS bile uspešne u otkrivanju mnogih gena podložnosti IBD, ovi geni objašnjavaju manje od 25% nasleđivanja ove bolesti. Ovakve studije dobre su za otkrivanje gena podložnosti koji su česti u populaciji, dok manje zastupljene alele teže otkrivaju (19).

Varijante gena povezane sa IBD su zapravo prilično česte u populaciji i objašnjavaju samo mali procenat (do 20%) procenjenog genetskog rizika. Prvi otkriven gen povezan sa Kronovom bolešću bio je NOD-2. Gen kodira senzor za intraćelijsko detektovanje muramil dipeptida (*muramyl dipeptide* - MDP), komponente ćelijskog zida bakterija (gram pozitivnih i

negativnih) (21). Interakcija NOD-2 i MDP dovodi do aktivacije nuklearnog faktora κ B (NF κ B) preko serin/treonin protein kinaze 2 koja interaguje sa receptorom (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2* - RIPPK2) i u saradnji sa inflamazomima dovodi do pospešivanja sekrecije IL-2b (22). NOD-2 polimorfizmi povezani sa KB dovode do izostanka njegove funkcije u aktivaciji NF κ B dovodeći do neodgovarajućeg odgovora na bakterije što doprinosi nastanku hiperinflamatornog fenotipa. Osim toga, pokazano je da NOD-2 deficit dovodi do pojačane aktivacije NLRP3 u odgovoru na mikroorganizme (22). Nadalje, jedna od varijanti NOD2 u monocitima ljudi dovodi do inhibicije IL-10 što ovu mutaciju povezuje sa neadekvatnom imunom regulacijom (24). Ova saznanja značajna su i zato što upućuju na značaj urođenog imuniteta u patogenezi IBD. Iako polimorfizmi pomenutog gena predstavljaju najjači do sada otkriveni genetski faktor rizika za KB sa veličinom efekta (*effect size* - ES) od 3, oni su pokazani samo kod manjine obolelih evropskog porekla, dok su u azijskoj populaciji obolelih skoro neprisutni. Zapravo u populaciji obolelih u istočnoj Aziji dominantan je TNFSF15 genski lokus. Procena je da čak 97% nosilaca NOD-2 polimorfizma nikada neće razviti KB. Međutim, interesantno je da je kod obolelih nosilaca ileum zahvaćen češće, zatim da češće razvijaju striktore i imaju češću potrebu za hirurškim intervencijama (21). Od gena važnih za razvoj IBD postoji još jedan gen, CARD9, čija je funkcija povezana sa signalnim putevima uključenim u detektovanje mikroorganizama. CARD9 je potreban za indukciju produkcije citokina u fagocitima u odgovoru na gljivice, čime dolazi do aktivacije T_H17 imunskog odgovora. Neke od varijanti ovog gena mogu predisponirati IBD dok druge deluju protektivno (22).

Značajni genski lokusi povezani sa KB su lokusi povezani sa autofagijom ATG16L1 i IRGM. Autofagija ima centralnu ulogu u reciklaži organela i ostale biomase. Ona zapravo predstavlja ćelijski sistem za odstranjivanje koji višak citoplazmatskog sadržaja usmerava ka lizozomima radi razgradnje. Nadalje, autofagija olakšava sekvestraciju intraćelijskih bakterija i time ima ulogu u odbrani ćelije (25). Faktor rizika za KB predstavlja varijanta ATG16L1 gena koja ga čini podložnijim na degradaciju kaspazom što u stanjima produžene apoptotske stimulacije može da dovede do defekta u autofagiji i hroničnog zapaljenskog stanja (23). Miš kome je u genom ubačena ova genska varijanta ima poremećaj autofagije u odgovoru na bakterije iz creva i produkuje više IL1b u odgovoru na stimulaciju inflamazomom. Osim toga, ona utiče i na granule Panetovih i peharastih ćelija remeteći sekreciju antimikrobnih proteina odnosno mukusa u njima (22).

Sa autofagijom je povezan i gore pomenuti NOD2 lokus. On je, naime, povezan sa obradom bakterija i njihovom prezentacijom u sklopu glavnog kompleksa tkivne kompatibilnosti (*major histocompatibility complex* - MHC) klase 2 (23). NOD2 aktivacija putem MDP u dendritskim ćelijama dovodi do započinjanja autofagije. Nosioци NOD2 varijante podložnosti KB imaju poremećaj započinjanja autofagije praćen smanjenim brojem bakterija u autofagolizozomima (26).

Citokin IL-23 važan je u ranom odgovoru na mikroorganizme, on predstavlja sponu između urođenog i stečenog imunskog odgovora (24). Genetske varijante koje dovode do poremećaja stabilnosti, sazrevanja i transporta IL23 receptora (IL23R) i time remete njegovu ekspresiju, povezane su sa IBD (23). Ovakve promene na nivou receptora slabe aktivnost IL23. Ovaj citokin makrofaga kroz stimulaciju produkcije IL22 u T ćelijama potencira lučenje hemokina epitelnih ćelija creva čime se povećava infiltracija creva neutrofilima i pogoršava zapaljenje. S druge strane, IL12B genski lokus, čiji je proteinski produkt sastavni deo IL23 heterodimera povezan je sa povećanim rizikom od IBD (22). I drugi geni (STAT3 i JAK2 – prenos signala, CCR6, receptor na ćelijama koje sekretuju IL-17) povezani sa IL-23/IL-17 osovinom predstavljaju rizik za IBD. IL23R polimorfizmi povezani su sa oba glavna fenotipa IBD, te IL23 put zapravo može biti karakterističan za hronično crevno zapaljenje (24).

HLA aleli zaduženi za obradu i prezentaciju antigena koji predstavljaju najjači genetski faktor rizika za mnoge autoimunske poremećaje odgovorni su za 3% varijanse u UK i 6% u KB (23).

Genetska predispozicija, konkretno genetski lokusi FOXO3, XACT, IGFBP1 i HLA region povezana je i sa prognozom KB. Zanimljivo je da ni jedan od pomenutih lokusa nije povezan sa razvojem KB (21).

Pokazano je da neke genetske varijante koje remete funkciju IL-10 dovode do VEOIBD, dok druge varijante koje utiču na njegovu funkciju predstavljaju i faktor rizika za razvoj IBD u populaciji u kojoj je bolest počela u odraslom dobu. IL-10 u makrofagama značajan je za ograničenje zapaljenja u crevima (22).

Kada je UK u pitanju glavni genetski faktori rizika su geni koji kontrolišu integritet epitelne barijere - C1orf106, RNF186 i HNF4, LAMB1, CDH1 (22, 27). Smatra se da poremećeno funkcionisanje epitelne barijere potencira hronično zapaljenje creva posredovano mikroorganizmima koji ih kolonizuju. CDH1 gen kodira glavnu komponentu adherentnih veza - E kadherin, dok LAMB1 kodira komponentu intestinalne bazalne membrane (27). C1orf106j gen reguliše degradaciju proteina citohezina koji je potreban za funkciju ARF6 gena. Dok ARF6 gen, ulogom u obnovi membranskih receptora, između ostalih kadherina koji formiraju adherentne veze između enterocita, učestvuje u očuvanju crevne epitelne barijere. Varijanta ovog gena, koja predstavlja rizik za UK, povezana je sa visokim nivoima citohezina, defektnim remodelovanjem adherentnih veza i posledičnim poremećajem funkcije epitelne barijere. Na RNF186 genskom lokusu identifikovana je varijanta gena koji predstavlja rizik za UK, ali i varijanta koja štiti od iste bolesti. Gen kodira ubikvitin ligazu za koju se pretpostavlja da potencirajući razgradnju okludina, remeti veze između crevnih epitelnih ćelija i time funkciju crevne barijere, čime se potencira rizik za nastanak UK. Na koji način protektivne varijante štite od UK još uvek nije razjašnjeno (22).

IBD u dečijem uzrastu nekada je posledica mutacije samo jednog gena; ovo je posebno čest slučaj ukoliko se bolest javi pre druge godine. Naime, najveći broj slučajeva IBD sa početkom u ovom uzrastu prestavlja monogensku bolest. Uzročne genske varijante su toliko retke da ne mogu biti detektovane u GWAS studijama. Međutim, savremene studije koje uključuju genetsko sekvenciranje i mapiranje uspele su da identifikuju oko 50 gena povezanih sa imunopatologijom sličnom IBD. Ovi monogenetski defekti remete crevnu homeostazu uzrokujući poremećaje epitelne barijere i epitelnog odgovora, kao i smanjenje eliminacije bakterija od strane fagocita. Nadalje, mogu biti u pitanju defekti koji dovode do stanja preteranog zapaljenja ili zapaljenja u odgovoru na sopstveno tkivo, dok neki od njih uzrokuju poremećene selekcije i aktivacije T i B limfocita (26). Recimo, mutacije koje dovode do gubitka funkcije IL-10 ili njegovog receptora uzrokuju VEOIBD. Javlja se monogenska bolest sa maksimalnom penetrantnošću (100%). Obolela deca razvijaju upalu debelog creva već u prvim nedeljama nakon rođenja (26).

S obzirom da je bolest poligenetska određivanje pojedinačnih varijanti gena neće mnogo pomoći u skriningu pacijenata. Stoga je primena poligenetskog skora rizika mnogo uputnija. Ovaj skor objedinjuje alele koji predstavljaju rizik za bolest. Ovakav skor bi se u budućnosti mogao koristiti za predviđanje nastanka bolesti i prevenciju u kombinaciji sa drugim prediktorima (21).

1.7. Uloga mikrobioma u nastanku IBD

Creva ljudi kolonizovana su trilionima mikroorganizama (bakterije, virusi, gljivice, protozoe). Samo bakterija u gastrointestinalnom traktu (GIT) ima preko 1000 vrsta.

Mikrobiom, genom svih bakterija prisutnih u GIT, sadrži 100 puta više gena od ljudskog genoma. Velika većina crevnih bakterija (99%) spada u sledeća četiri reda: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Kod zdravih ljudi dominiraju bakterije iz redova *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (28). Debelo crevo sadrži najveći broj i poseduje najveću raznolikost mikroorganizama (20). Crevni mikroorganizmi vrlo su korisni po zdravlje domaćina. Oni doprinose zaštiti od patogenih mikroorganizama, imaju nutritivnu i metaboličku ulogu i pomažu razvoju imunog sistema (28).

Iako postoji više linija dokaza koje pokazuju povezanost mikrobioma sa patogeneom IBD, postojanje uzročno posledične veze još uvek nije dokazano. Kada su studije na životinjskim modelima u pitanju, pokazano je da miš koji živi u sredini bez mikroorganizama ne razvija ovu bolest iako je za to genetski predisponiran. Ovo ukazuje na neophodnost mikroorganizama za razvoj IBD. Zatim, u eksperimentu u kome su creva miša kolonizovana mikrobiotom ljudi obolelih od IBD došlo je do pogoršanja zapaljenja. U drugoj studiji, kolitis kod miša, kome nedostaju T i B limfociti, izazvan je naivnim CD4⁺ ćelijama, a podložnost ovih miševa kolitisu zavisila je od razlika u sastavu crevne mikroflore. Dokazi o povezanosti mikrobioma sa razvojem IBD kod ljudi su takođe brojni. Naime, IBD se češće razvija u debelom crevu u odnosu na druge delove digestivnog trakta, a kao što je gore pomenuto ovaj deo creva je najbogatiji bakterijama. Takođe, bolest pokazuje predilekciju za terminalni ileum i rektum, mesta na kojima postoji relativna staza crevnog sadržaja (20). Pacijenti oboleli od IBD u poređenju sa zdravim osobama imaju različit sastav crevne mikroflore, smanjenu raznovrsnost bakterija, a pokazano je da i broj mikroorganizama može da se razlikuje. Naime IBD pacijenti generalno imaju manje raznoliku mikrofloru uz smanjenu zastupljenost bakterija iz roda *Firmicutes* i povećanu zastupljenost bakterija iz roda *Proteobacteria* (19). Neke studije pokazale su i povećanje broja bakterija koje pripadaju rodovima *Proteobacteria* i *Bacteroidetes*, ali studije nisu konzistentne po ovom pitanju (28). Osobe sa novodijagnostikovanim KB i UK imaju izrazitu redukciju klostridija (29). Na značaj crevne mikroflore u patofiziologiji IBD ukazuje i uspešno korišćenje antibiotika u lečenju nekih stanja koje se mogu javiti u okviru ove bolesti kao što su perianalna KB i paučitis (zapaljenje rezervoara hirurški napravljenog od ileuma nakon potpunog uklanjanja debelog creva). Zatim, ovi lekovi se uspešno koriste u prevenciji ponovnog javljanja KB nakon operacije (20).

Na to da je mikrobiom važan činilac u razvoju IBD ukazuje činjenica da brojni genetski i sredinski faktori povezani sa ovom bolešću utiču na njega. Kada govorimo o genetskim faktorima, geni podložnosti IBD kao što su NOD2 i ATG16L1 imaju ulogu upravo u detektovanju i uklanjanju mikroorganizama čime se omogućava da samo odgovarajuće bakterije ostanu u organizmu (19). Kod ljudi sa potvrđenom NOD2 mutacijom postoji izmenjen sastav crevne flore koji se karakteriše smanjenom brojnošću bakterija koje pripadaju vrsti *Faecalibacterium* uz povećanu brojnost bakterija koje pripadaju vrsti *Escherichia*. T300A varijanta ATG16L1 gena ima uticaj na porast bakterija vrste *Bacteroides* kod miševa. Kao što je već rečeno, polimorfizmi CARD 9 povezuju se sa IBD, a ovaj gen igra ulogu u odgovoru organizma na gljivice. Miševi bez ovog gena povećano su podložni gljivičnim infekcijama (20).

Od sredinskih faktora sa uticajem na mikrobiom izdvaja se smanjena izloženost mikroorganizmima tokom odrastanja (apostrofirana u higijenskoj hipotezi) usled povećane upotrebe antibiotika, boljih higijenskih uslova i urbanizacije. Ovakvi uslovi mogu negativno uticati na razvoj stečenog imuniteta. Nadalje, studije pokazuju da infektivni gastroenteritis povećava rizik od nastanka IBD. Izgleda da u sklonih osoba (po sastavu crevne mikroflore) infektivni gastroenteritis može uzrokovati poremećaj imunog odgovora (20). Ishrana odojčeta majčinim mlekom pokazala je zaštitnu ulogu (30). Moguće je da i ovaj sredinski faktor deluje

preko mikrobioma s obzirom da majčino mleko ima pre- i probiotsku funkciju i štiti od infektivnih gastroenteritisa (20). Ishrana bogata mastima, kao i omega-6 masnim kiselinama predstavljala je rizik od nastanka IBD. Ishrana koja sadrži velike količine povrća štiti od UK, a voće i vlakna smanjuju rizik od KB. Ovakvi efekti ishrane verovatno su posredovani njenim uticajem na mikrobiom. Ishrana bogata mesom povećava brojnost bakterija koje su otporne na žučne kiseline, a kada je hrana pretežno biljnog porekla dolazi do rasta bakterija iz roda *Firmicutes*. Bakterija ovog roda sa antiinflamatornim svojstvima, *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), smanjene je brojnosti u obolelih od KB.

Značaj pomenute bakterije, jedne od najbrojnijih anaeroba mikrobiote zdravih osoba, (pripada *Clostridium* grupi IV), u patogenezi IBD je veliki. Ova bakterija sa potvrđenom antiinflamatornom ulogom manje je zastupljena u fecesu obolelih od IBD, što je naročito izraženo kod intenzivnije bolesti (31). Pojava relapsa i vraćanja bolesti nakon operacije povezana je sa njenom brojnošću (28, 32). Značajno je da monociti periferne krvi kada se stimulišu *F. prausnitzii* pojačano luče antiinflamatorni IL-10, a smanjeno proinflamatorne citokine (28). Pokazana je njena povezanost sa proizvodnjom salicilne kiseline koja ima protivupalno dejstvo. Takođe, produkuje mikrobni anti inflamatorni molekul (microbial anti-inflammatory molecule - MAM) koji inhibira NF kB signalni put u epitelnim ćelijskim linijama. Pomenuti protein štiti je od kolitisa miša (20). Ovaj komensal sposoban je da produkuje masne kiseline kratkog lanca (*short chain fatty acids* – SCFA). U ovu vrstu masnih kiselina spadaju acetat, propionat i butirrat. Druge bakterije koje su sposobne da proizvode SCFA fermentacijom dijetetskih vlakana su i *Roseburia hominis* i *Eubacterium rectale* (19). *Roseburia hominis* takođe je smanjene brojnosti u pacijenata sa aktivnim IBD (33). *F. prausnitzii* proizvodi kratkolančanu masnu kiselinu butirrat (28). Butirrat je značajan za homeostazu GIT, s obzirom na svoju imunoregulatornu ulogu – stimuliše diferencijaciju i ekspanziju regulatornih T-limfocita (Treg) (28), a ima ulogu u ojačavanju mukusne barijere – pospešuje produkciju mukusa u peharastim ćelijama (29). Diferencijacija Treg stimulisana je i posredstvom drugih bakterija iz grupe *Clostridium* (*XIVa*, i *XVIII*) i *Bacteroides* (*B.*) *fragilis* (29). Butirrat dovodi do ushodne regulacije FoxP3 transkriptornog faktora važnog za diferencijaciju Treg najverovatnije epigenetskim mehanizmom kroz inhibiciju histon deacetilaze. Verovatno da SCFA modulišu imuni odgovor i putem G proteinskog receptora GPR43 (33).

Kompozicija žučnih kiselina u crevima ima uticaj na sastav mikrobiote, a s druge strane crevni komensali neophodni su u metabolizmu žučnih kiselina. Naime, bakterije koje poseduju enzime hidrolaze žučnih soli (bile salt hydrolase - BSH), dekonjuguju žučne soli u crevima. Nadalje, bakterije učestvuju u metabolizmu žučnih kiselina kroz njihovu dehidroksilaciju. Produkti bakterijskog metabolizma žučnih kiselina deluju na FXR i TGR5 receptore. U crevima FXR pospešuje funkciju crevne barijere i deluje protivupalno. Usled sniženja broja bakterija iz roda *Firmicutes*, smanjen je i broj njihovih BSH gena. Kod KB postoji porast konjugovanih žučnih kiselina u stolici u odnosu na zdravu populaciju. Višak konjugovanih žučnih kiselina u crevima dovodi do pogodnih uslova za razvoj bakterija koje su rezistentne na žučne kiseline kao što je *Bilophila wadsworthia*. Ova bakterija proizvodi hidrogen sulfid (H₂S) redukcijom taurina u crevima. Izvor taurina su žučne kiseline koje su njime konjugovane. Pacijenti oboleli od UK imaju više H₂S u fecesu u odnosu na zdrave osobe. H₂S onemogućava korišćenje SCFA u crevima za ishranu kolonocita inhibicijom njihove beta oksidacije, stimuliše T ćelijsku aktivaciju, a dovodi i do genomske oštećenja. Interesantno, ali neke studije pokazale su i da H₂S ima pozitivna dejstva na crevnu mukozu pomažući njeno zaceljivanje, a pokazano je i njegovo protivupalno dejstvo (33).

Metaboliti indola indolakrilna kiselina (indoleacrylic acid - IA), proizvod bakterija vrste *Peptostreptococcus* i indol 3-propionska kiselina proizvod bakterije *Clostridium sporogenes* regulišu intestinalnu barijeru dejstvom na receptor za ksenobiotike (*xenobiotic*

sensor pregnane X receptor), uz to IA deluje protivupalno (29). Indolna jedinjenja koja proizvode bakterije deluju i na aril hidrokarbon receptor – (*aryl hydrocarbon receptor* - AHR). Ekspresija ovog receptora smanjena je kod pacijenata obolelih od IBD. Značajna za patogenezu IBD je njegova uloga u diferencijaciji T-ćelija. Kod miševa kojima nedostaje CARD9, nastaje zapaljenje izazvano usled nemogućnosti sinteze indolnih jedinjenja od strane bakterija, a zapaljenje slabi kada se creva miša kolonizuju bakterijom *Lactobacillus*, sposobnom da proizvodi ova jedinjenja (19). Ovo predstavlja jedan primer kako bi promene u mikrobiomu kod genetski predisponiranih osoba mogle da utiču na patogenezu IBD.

Broj Proteobakterija, prevashodno *Escherichia (E) coli*, povećan je u uzorcima mukoze pacijenata obolelih od KB u odnosu na njihovu stolicu. Za IBD najvažnija *E. coli* je adheziono invazivna (adhesion-invasive *E. coli* - AIEC). Ova bakterija izrazito je povećana kod pacijenata sa aktivnim KB u odnosu na zdrave osobe. Ona remeti permeabilitet creva, podstiče inflamaciju i utiče na sastav crevne mikrobiote (28).

Sastav drugih komponenti mikrobiote, virusa i gljivica, takođe je poremećen u IBD. Kada su gljivice u pitanju osobe obolele od UK imaju smanjenje njihovog broja kao i osobe obolele od KB, ali bez zahvatanja ileuma, dok su KB pacijenti kojima je ovaj segment zahvaćen pojačano kolonizovani gljivicama. Postoji smanjenje u broju *Saccharomyces cerevisiae* uz porast broja gljivica poput *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae* i drugih. Interesantno je da gljivica koja pretežno nastanjuje kožu, *Malassezia restricta*, postoji u značajnim količinama u crevima obolelih od KB. Gljivice ove vrste pospešuju produkciju citokina iz imunih ćelija u kojima postoji mutacija CARD9 gena, koji je kao što je već rečeno povezan sa patogeneзом IBD. Osim toga, *Malassezia* pogoršava kolitis kod miša. Kada su virusi u pitanju kod IBD pacijenata je pokazan porast *Caudovirales bacteriophage* (20).

1.8. Uloga faktora sredine u nastanku IBD - „Ekspozom“

Termin ekspozom sumira kompletnu izloženost osobe sredinskim faktorima od momenta začeća, pa sve do smrti (34).

„Higijenska hipoteza“ nastala je kao pokušaj objašnjenja ekspanzije alergijskih bolesti. Ona pretpostavlja da je abnormalan imunski odgovor poput alergije ili autoimunosti posledica poboljšanja higijene do koga je došlo usled smanjenja broja članova koji žive u jednom domaćinstvu i generalno bolje lične higijene čime su ljudi postali manje izloženi mikroorganizmima. Primenom ove hipoteze na IBD razvile su se „Mikroflora hipoteza“ i „IBD higijenska hipoteza“. „Mikroflora hipoteza“ predlaže da „zapadnjački“ način života koji karakterišu promene u ishrani i upotreba veće količine antibiotika dovode do promena u mikroflori creva. Nadalje, ove promene smanjuju imunu toleranciju posredovanu mikroorganizmima. „Higijenska hipoteza“ može da objasni porast incidencije bolesti u populaciji migranata koji se sele u imućnije zemlje i generalno porast incidencije bolesti u zemljama koje postaju imućnije, ali ne može se primeniti na ostale slučajeve (35).

Način ishrane predstavlja značajan faktor rizika za razvoj IBD (36). Takozvanu „Zapadnu dijetu“ karakteriše „brza hrana“, visok unos rafiniranih šećera i omega-6 polisaturiranih masnih kiselina uz smanjen unos voća, povrća i vlakana. Studije sugerišu da je ovakav obrazac ishrane faktor rizika za nastanak IBD. Pretpostavka je da „Zapadna dijeta“ dovodi do povećane produkcije prozapaljenskih citokina, da utiče na permeabilnost creva i crevnu mikrobiotu. Pokazano je da ishrana koja podstiče zapaljenje predstavlja faktor rizika za nastanak UK. Kada je mikrobiota u pitanju, ovakva ishrana ne doprinosi razvoju protektivnih SCFA, ali zato proteini doprinose nastanku za creva toksičnih fenola, indola, organskih kiselina i amonijaka. Nadalje, visok unos šećera i masti uništava mikrobiotu vodeći

u disbiozu (poremećaj kompozicije rezidentnih komensala creva (37, 38). S druge strane, vlakna i povrće koji se smanjeno unose kroz „Zapadnu dijetu“ smanjuju intestinalni pH što štiti od patogenih vrsta kao što su *Enterobacteriaceae* i *E.Coli*. Povećan unos linoleinske, omega-6 polinezasićene masne kiseline, povezan je sa rizikom od UK. (38) Pacijenti oboleli od KB u toku dana unose velike količine ukupnih masti, životinjskih proteina i masti i proteina mleka. Vrlo interesantno, upotreba sukroze i određenih proizvoda poput žvakaće gume, koka kole, čokolade pozitivno je korelirala sa razvojem IBD. S druge strane, konzumacija citrusnog voća, povrća, omega 3 i omega 6 masnih kiseline pokazala je zaštitnu ulogu. Unos esencijalne aminokiseline triptofana ima značaj za IBD patogenezu s obzirom da predstavlja supstrat za sintezu metabolita (postredstvom bakterije *Lactobacillus*) koji deluju na već pomenuti AHR, čija stimulacija smanjuje imuni odgovor dendritskih ćelija (34). Neke studije pokazuju da je ishrana važnija za progresiju bolesti nego što je etiološki faktor za nastanak bolesti (36). Kao što je već pomenuto, ishrana je važan faktor i u ranom djetinjstvu; ishrana majčinim mlekom pokazala je zaštitnu ulogu (20). Majčino mleko bi moglo imati povoljan efekat zbog sadržaja protivupalnih materija, delovanja na crevnu mikrofloru i zaštitno dejstvo protiv crevnih infekcija (35).

Pokazano je da vitamin D može smanjiti incidenciju i povoljno uticati na aktivnost IBD. Naime, deficit vitamina D povezan je sa aktivnošću bolesti, dok suplementacija ovim vitaminom utiče na sniženje indeksa aktivnosti Kronove bolesti i poboljšava kvalitet života pacijenata. Ovaj vitamin smanjuje produkciju Th17 ćelija (35).

Neki često korišćeni lekovi kao što su nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) i oralni kontraceptivi su mogući uzroci relapsa. Relaps se u IBD pacijenata nakon lečenja lekovima iz grupe NSAIL može javiti u do 25% obolelih. Međutim, kada govorimo o lekovima, antibiotici imaju centralno mesto u patogenezi IBD s obzirom da direktno utiču na sastav crevne mikroflore čiji značaj u razvoju bolesti je prethodno objašnjen. Pokazano je da je osobama obolelim od IBD prepisano više antibiotika u odnosu na kontrolnu grupu u godinama koje su prethodile dijagnozi. Jačina povezanosti upotrebe antibiotika i IBD veća je u dečijoj populaciji nego kod odraslih (20). Deca sa dijagnozom IBD imala su tri puta veću šansu da dobiju antibiotik u prvoj godini života (uglavnom peniciline) u odnosu na decu koja nisu obolela (34). Studije su pokazale da kod dece koja su obolela od IBD postoji povećana šansa da su pre postavljanja dijagnoze imala epizodu zapaljenja srednjeg uha, oboljenja koje zahteva antibiotsku terapiju (20).

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis i enteroinvazivna *Escherichia coli* su mikroorganizmi koji se često povezuju sa razvojem IBD, iako čvrsti dokazi nisu pronađeni. Teza da infekcija predstavlja etiološki faktor sredine za nastanka IBD još uvek nije napuštena, a značaj infekcije potkrepljuju nalazi GWAS koji IBD povezuju sa genskim lokusima povezanim sa kolonizacijom periodontalnim patogenima i podložnošću teškim formama falciparum malarije (34). Nadalje, epizoda gastroenteritisa za 40% povećava rizik od posledičnog nastanka IBD, a osobe koje su imale gastroenteritis imaju 2 do 3 puta veću šansu da razviju IBD (20).

Interesantno je da pušenje različito utiče na KB i UK. Naime, pušači imaju povećanu šansu da razviju KB. Tek četiri godine nakon prestanka pušenja ovaj rizik se smanjuje (36). Kod ovih pacijenata bolest je agresivnija i češće zahteva hiruršku terapiju (34). S druge strane, prekid pušenja povezan je sa nastankom UK (34), pušenje olakšava simptome UK (36) i poboljšava prognozu bolesti (35). Interesantno je i da se rizik od UK kod bivših pušača povećava sa brojem popuštenih cigareta pre prestanka pušenja (35). Ovakav oprečni efekat mogao bi se objasniti dejstvom nikotina koji u tankom crevu povećava, a u debelom smanjuje sintezu azot oksid sintaze enzima koji indirektno doprinosi nastanku slobodnih kiseoničkih vrsta (36). Osim

toga pušenje bi kod pacijenata sa UK moglo da moduliše imuni sistem pojačanom sintezom IL-10 pod dejstvom ugljen monoksida iz cigareta, smanjenom produkcijom faktora nekroze tumora (tumor necrosis factor - TNF alpha), kao i pojačanjem stvaranja mucina. Negativan efekat pušenja na KB mogao bi biti posledica ishemije hronično upaljene mikrovaskulature usled poremećaja vazodilatacije uzrokovane ugljen monoksidom. Ovo bi moglo dovesti do nastanka ulceracija i fibroze (35). Efekat pušenja na IBD je verovatno posredovan i putem njegovog uticaja na crevnu mikrofloru. Naime, prestanak pušenja praćen je povećanjem broja bakterija koje pripadaju rodovima *Firmicutes* i *Actinobacteria*, uz smanjenje onih koje pripadaju rodovima *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* (34).

Slično kao i pušenje i uklanjanje apendiksa (crvuljka) ima suprotan efekat na dva glavna fenotipa IBD. Za UK se ova operacija pokazala protektivno, dok pacijenti sa uklonjenim crvuljkom imaju veću učestalost KB. Osim toga, apendektomija učinjena zbog perforacije predstavlja veći rizik za nastanak KB u odnosu na druge razloge (39).

Zagađenje životne sredine može doprineti nastanku IBD. Zagađenje vazduha, naročito je prisutno u Aziji, upravo na kontinentu gde se beleži najveći porast incidence IBD. Nadalje, pokazano je da desetostruki porast emisije zagađivača povećava hospitalizaciju pacijenata sa IBD za 40%. Osim toga, mladi koji žive u sredini gde je koncentracija NO₂ visoka imaju povećan rizik od KB. S druge strane, zagađenje vode ne samo što utiče na porast IBD incidencije već može doprineti nastanku relapsa i slabijem odgovoru na terapiju. Konkretno, pokazano je da flaširana voda, sve više u upotrebi poslednjih godina, sadrži antagoniste steroidnih receptora, a neki od ovih receptora, poput glukokortikoidnog i receptora aktiviranih proliferatorom peroksizoma (peroxisome proliferator-activated receptor - PPAR), značajni su u IBD patogenezi (34).

Poremećaji sna, takođe se povezuju sa IBD. Sporotalasno spavanje, deo je sna koji najviše okrepljuje i najznačajniji je kada je regulacija imunog sistema u pitanju. U ovoj fazi i kolon može „odmarati“ tj. dolazi do smanjenja njegove kontraktilnosti. Stoga, poremećaji ove faze sna mogu poremetiti mukoznu crevnu barijeru i generalno uticati na fiziologiju gastrointestinalnog sistema. Osim toga, pokazano je da poremećen san kod mladih dovodi do porasta zapaljenskih citokina važnih za patofiziologiju IBD (35).

1.9. Uloga imunoloških faktora u nastanku IBD

1.9.1. Poremećaji urođenog imuniteta

Mukusna barijera je prva fizička barijera na koju nailaze mikroorganizmi i antigeni. Ona sprečava ulazak bakterija i zapaljenje (40). Ispod nje se nalazi intestinalna epitelna barijera koja se sastoji se od jednog sloja ćelija povezanih tesnim vezama (27). Osim enterocita u intestinalne epitelne ćelije spadaju i specijalizovane peharaste i Panetove ćelije (40). Barijera je selektivno propustljiva, te propušta tečnost i nutrijente, dok ograničava ulazak mikroorganizama i antigena i njihov kontakt sa mukoznim imunim sistemom. Ovakva selektivnost omogućava razvoj oralne tolerancije na komensale i antigene uz obezbeđivanje odbrane od patogena. Ova barijera poremećena je kod IBD. Kao što je već pomenuto, GWAS studije identifikovale su lokuse podložnosti UK povezane sa epitelnom barijerom. Povećana propustljivost crevne barijere postoji kod obolelih od IBD. Prozapaljenski citokini dovode do oštećenja tesnih veza i apoptoze ćelija i time povećavaju propustljivost ove barijere (27). Kod ove bolesti može doći do poremećaja apsorptivnih ćelija u kolonu. Nadalje, peharaste ćelije, ćelije koje proizvode mukus, mogu biti na pogrešnoj poziciji što koincidira sa smanjenim lučenjem antiproteaze koja čuva integritet tesnih veza (27). Takođe, smanjenje broja ovih ćelija često postoji kod IBD, a pokazano je da neadekvatna sekrecija mukusa dovodi do hroničnog zapaljenja. Osim mucina one luče imunoregulatorni IL-7, a uključene su i u

dopremanje antigena dendritskim ćelijama (41). Panetove ćelije, predstavljaju intestinalne epitelne ćelije koje sekretuju antimikrobne proteine poput defenzina, u poslednje vreme se povezuju sa IBD patogeneom. Naime, pomenuti NOD2 gen, koji povećava rizik od KB, povezan je sa smanjenim lučenjem defenzina u Panetovim ćelijama. ATG16L1, takođe gen rizika za KB, može remetiti stvaranje normalnih intraćelijskih granula u ovim ćelijama. U studiji na miševima pokazano je da disfunkcija Panetovih ćelija može samostalno dovesti do razvoja KB u ileumu (41).

Limfoidne ćelije urođenog imuniteta (*innate lymphoid cells*- ILCs) kao što im i ime kaže predstavljaju ćelije nastale od limfoidnog progenitora, a pripadaju urođenom imunitetu. Iako se ranije mislilo da su jedini predstavnici ove grupe ćelije ubice (*natural killer cells*-NK ćelije), danas se zna da NK ćelije predstavljaju samo jedan od brojnih podtipova ove grupe. ILCs su nedavno klasifikovane u tri grupe koje po citokinima koje luče predstavljaju pandan T pomoćnim (*T helper* -Th) ćelijama stečenog imuniteta. Prva grupa ILCs poput Th1 ćelija luči uglavnom IF gama (u ovu grupu spadaju NK ćelije), druga grupa luči IL-5 i IL-13 kao i Th2 ćelije, dok treća grupa luči citokine Th17 ćelija IL-17 i IL-22. Skorašnje studije povezale su upravo ovu poslednju ILCs sa IBD. Ove ćelije inače povezane sa autoimunskim bolestima bile su uključene u razvoj kolitisa na animalnom modelu IBD. Glavni predstavnik treće grupe ćelija Lymphoid Tissue inducer (LTi) ćelije pokazale su se u eksperimentima kao ćelije koje izazivaju kolitis i bile su neophodne za početak ove bolesti (42).

1.9.2. Poremećaji stečenog imuniteta

Pomoćničke T ćelije (Th1, Th2 i Th17) pokazale su se značajnim u IBD patogenezi. Misli se da je KB bolest sa prejakim izraženim Th1 imunim odgovorom. U prilog značaja Th1 imunog odgovora za ovu bolest govori da je citokin koji indukuje stvaranje Th1 ćelija, IL12, preekspimiran u makrofagima kod KB, dok Th1 ćelije sluznica proizvode više IL-2 i IF γ u odnosu na UK i kontrolnu grupu (24). Određen značaj Th2 ćelija, ćelija čiji glavni citokini su IL-4, IL-5 i IL-13, pokazan je kod UK. Glavni dokazi za ovu tvrdnju dolaze iz studija koje pokazuju da oboleli od UK stvaraju veće količine IL-5 i da njihove atipične NK T ćelije (NKT) stvaraju više IL-13 u odnosu na obolele od KB (42). Međutim, podaci iz skorašnjih studija koji pokazuju da kod biopsija obe bolesti (kultivisanih *ex vivo*) postoji visok nivo IF γ , uz niži IL-13 kod UK pacijenata u odnosu na obolele od KB, dovode u pitanje ovu Th1 - KB i Th2 – UK paradigmu (42). Uloga Th17 ćelija u IBD patogenezi je takođe komplikovana. Nastanak ovih ćelija je indukovano kombinovanom stimulacijom IL-6 i transformišućeg faktora rasta beta (transforming growth factor beta - TGF- β) dok IL-23 dovodi do njihove ekspanzije. Ove ćelije sintetišu IL-17A, IL17F, IL-21 i IL-22 (24). Glavni transkriptorni faktor ovih ćelija je ROR γ t. Th17 ćelije koje luče IL-17 i Th1/Th17 ćelije koje luče IF γ i IL-17 su dve glavne potklase ovih ćelija. GWAS su identifikovale lokuse podložnosti prvenstveno KB (mada ima onih koji su zajednički za obe bolesti) povezane sa Th17 ćelijama: IL-23R, IL-12B, JAK2, STAT3, CCR6 i TNFSF15. Nadalje, KB i UK pacijenti imaju više IL-17 i Th1/ Th17 u lamini propriji u odnosu na kontrole kao i veću transkripciju IL-17A u mukozi. Uz to, u T-ćelijama lamine proprije obolelih od KB ROR γ t je povećano ekspimiran. Međutim, iako su neki eksperimentalni modeli potvrdili patogenost Th17 ćelija kod IBD, ima modela koji su pokazali protektivno dejstvo IL-17A. Nadalje, terapija blokatorom IL-17 nije se pokazala uspešnom u kliničkoj studiji iako je bila korisna kod pacijenata sa odgovarajućom genetikom (42).

Treg ćelije koje ekspimiraju Foxp3, suprimiraju umnožavanje nediferenciranih pomoćničkih T ćelija (Th0). Ove ćelije lučeći antiinflamatorne citokine IL-10 i TGF- β u crevima suprimiraju abnormalan imunski odgovor protiv komensala creva i antigena iz hrane. Kada je IBD u pitanju Treg su se pokazale kao protivupalne u eksperimentalnom kolitisu (24). Interesantno je da su kod IBD pacijenata u odnosu na kontrole Treg bile snižene samo u

perifernoj krvi, a povećane i funkcionalne u sluznici creva, premda treba naglasiti da je ovaj porast u crevima niži u odnosu na njihov porast kod infektivnog enteritisa i divertikulitisa. U ovoj bolesti pokazana je i rezistencija efektorskih T ćelija na Treg stimulaciju koje produkcijom velikih količina Smad7 inhibišu TGF- β signalni put (27). Zanimljivo je i saznanje da Treg pod uticajem IL-6 mogu eksprimirati IL-17 umesto Foxp3 čime se pretvaraju u ćelije slične Th17 limfocitima, dok reverzija ovog procesa nije pokazana. Ovo bi moglo biti važno u početku hroničnog zapaljenja (24).

1.10. Uloga slobodnih kiseoničnih vrsta u patogenezi IBD

Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže produkcije ROS (reactive oxygen species) u oksidativnim procesima i antioksidativnih sistema. Oksidativni stres ima značaj u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma, starenja, a moguće i IBD. Naime, u ovoj bolesti leukociti (polimorfonukleari, B i T limfociti) se nakupljaju u crevu u pokušaju uništenja patogena pretežno povećanom produkcijom ROS. Produkuju se hidroksilni radikal, superoksidni anjon i hipohlorit. Hidroksilni radikal može oštetiti mukus debelog creva na taj način mu smanjujući prirodnu zaštitu. Nadalje, leukociti i mastociti luče veliku količinu proteaza koje oštećuju ćelije creva i tesne veze među njima. Oštećena epitelna barijera propušta bakterije u laminu propriju, nastaje stimulacija T limfocita i produkcija citokina čime se bolest pogoršava.

Nedavno su rađene studije koje su pokazale viši nivo oksidativnog stresa i sa njim povezanih enzima kod aktivne KB u poređenju sa remisijom. Azot monoksid može doprineti produkciji ROS, ali i delovati antioksidativno. Nivo ovog molekula bio je povišen kod IBD uz njegovu pozitivnu korelaciju sa aktivnošću bolesti i višim nivoima kod KB u odnosu na UK. I na kraju, pokazan je deficit u antioksidativnoj zaštiti na životinjskim modelima. Antioksidansi su moguće smanjeni usled prevelike potrošnje za neutralizaciju slobodnih radikala nastalih u zapaljenju, ali i kao posledica promena u ishrani, smanjenog unosa voća i povrća koji predstavljaju prirodne izvore antioksidanasa (36).

1.11. Oligoelementi u patogenezi IBD

Esencijalni metali za ljude su „makrominerali“ (Ca, K, Mg i Na) i elementi u tragovima (Co, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn). Jod i selen spadaju u esencijalne nemetale. Premda jesu esencijalni, elementi u tragovima kada su prisutni u visokoj koncentraciji mogu ispoljiti toksičnost. S druge strane, toksični teški metali (arsen -As, kadmijum -Cd, hrom -Cr (VI), olovo (Pb) i živa -Hg) mogu delovati štetno već i u malim koncentracijama. Osim toga, pri visokom opterećenju organizma aluminijumom i ovaj metal može pokazati toksičnost (43).

Deficit u makro i mikronutrijentima koji uključuju i elemente u tragovima pokazan je kod 20 do 85% IBD pacijenata. Poremećaji u nivou elemenata u tragovima imaju uticaj na celokupno funkcionisanje organizma uključujući i digestivni trakt, te time mogu dovesti do početka IBD ili njegovog pogoršanja (relapsa). Obolela deca i adolescenti mogu naročito biti pogođeni zbog manjih rezervi i povećanih potreba neophodnih za rast i razvoj (43). U uzroke ovih deficita ubrajamo smanjen unos i smanjenu crevnu apsorpciju, uz stalno prisustvo bolesti (44). Osim toga, studije pokazuju porast incidencije IBD sa razvojem industrijalizacije (43), a zagađenje vode i vazduha ima određen značaj u patogenezi IBD (34). Kako je zagađenje teškim metalima jedan od glavnih problema današnjice kada je zaštita životne sredine u pitanju, i kako je pokazano da toksični metali utiču na različite procese koji imaju značaj za IBD patogenezu (disbioza, zapaljenje, oksidativni stres) (43), logično je pretpostaviti da kao i esencijalni i toksični metali imaju uticaj na ovu bolest.

Magnezijum bi mogao biti značajan u IBD patogenezi s obzirom na to da ovaj metal ima uticaj na urođeni i stečeni imunitet, a njegov deficit pospešuje zapaljenje (43). Neke

studije pokazale su deficit magnezijuma u pomenutoj bolesti (43, 45). Deficit cinka često je prisutan kod IBD pacijenata, a naročito onih sa KB (43). Zn ima značaj u obnavljanju enterocita, očuvanju tesnih veza, stabilizaciji mukusnog pokrivača i produkciji antibakterijskih supstanci (46). Osim toga, ovaj metal ima protivupalna i antioksidativna svojstva (47). Ovakva svojstva poseduje još jedan oligoelement, selen, te bi i on mogao da bude značajan za ovu bolest, tim pre što neke studije pokazuju njegov deficit kod IBD pacijenata (47). S druge strane, bakar je metal koga mnoge studije povezuju sa sistemskim zapaljenjem, te ne čude njegove uglavnom povećane vrednosti kod IBD pacijenata (43). Novije studije na životinjama povezuju i deficit mangana sa zapaljenjem, oksidativnim stresom, poremećajima crevne barijere prisutnim kod IBD (43).

Studije pokazuju da je gvožđe u krvi pacijenata obolelih od IBD sniženo (43, 48, 49) i da je anemija jedna od čestih komplikacija ove bolesti (36–90% anemija povezanih sa IBD izazvano je nedostatkom gvožđa) (50). Crevna mikrobiota koja kao što je pomenuto ima ogroman značaj u nastanku IBD može uticati na nivo gvožđa u organizmu (crevni mikrobi deluju na njegovu apsorpciju i bioraspoloživost), a deficit i višak gvožđa mogu uticati na crevnu mikrobiotu s obzirom da je gvožđe esencijalno za rast bakterija, dok je disbioza povezana sa poremećajima metabolizma gvožđa (51).

Uticaj toksičnih teških metala na IBD slabo je istražen. Međutim, kako ovi metali utiču na različite procese povezane sa IBD patogeneom (43) i kako incidencija IBD (1), ali i povećano zagađenje teškim metalima koincidiraju sa industrijalizacijom (52), postoji mogućnost njihove povezanosti. Kada su toksični teški metali u pitanju, pokazan je uticaj žive na imuni sistem, osim toga ovaj metal kod ljudi povećava markere zapaljenja, autoimunosti (53) i dovodi do oksidativnog stresa (52). Nadalje, ovi metali na različite načine mogu povećati oksidativni stres. Hrom i arsen posreduju redoks reakcije u biološkim sistemima čime se stvaraju slobodne kiseonične vrste, dok olovo i kadmijum na više načina dovode do njihovog povećanja. Za kadmijum je pokazano da povećava lipidnu peroksidaciju u određenim regijama mozga (52). Veza oksidativnog stresa sa IBD je prethodno pojašnjena. Nadalje, pokazana je povezanost teških metala sa autofagijom (54), dok hronična izloženost olovu dovodi do disbioze (55, 56) i moguće je da utiče na povećanu propustljivost crevne barijere (55, 56).

Interesantno je, međutim, da je jedna studija na animalnom modelu IBD pokazala povoljne efekte arsena. Povoljni efekti arsena u ovoj studiji bili su višestruki i uključivali su poboljšanje kliničkih znakova bolesti, zatim smanjenje makroskopskog oštećenja, obnavljanje integriteta mukoze kolona, smanjenje oksidativnog stresa i prevenciju povrede ćelija i apoptoze (57).

Iako je sveprisutan u životnoj sredini, zbog malog preuzimanja organizam generalno nije izložen visokim koncentracijama aluminijuma. Međutim, kako se aluminijum danas koristi kao aditiv u hrani izloženost epitela creva aluminijumu na ovaj način može biti znatna. U animalnim modelima kolitisa, aluminijum dat oralno pogoršavao je zapaljenje i remenio je funkciju crevne barijere (34). Ovaj metal može poremetiti funkciju epitelne barijere, uzrokovati disbiozu i moguće uticati na neke bakterije da lakše uzrokuju granulomatozno zapaljenje (43). TiO₂ nanočestice koje takođe spadaju u aditive hrane, ali i kozmetičkih proizvoda (pasta za zube) mogu pojačati zapaljenje kod predisponiranih osoba ukoliko ih preuzmu epitelne crevne ćelije. Ove čestice aktiviraju NLRP3 inflamazom koji aktivira prozapaljenske citokine IL-1b i IL-18 (34).

1.12. Morfometrija, fraktalna i GLCM teksturalna analiza

Precizna dijagnoza postavljena na vreme veoma je važna za IBD pacijente, kako bi se odgovarajući tretman bolesnika sproveo u najkraćem roku. Ovo je od posebne važnosti za

osetljive kategorije kao što su deca i adolescenti. Međutim, i dalje postoje poteškoće u IBD dijagnostici koje su posledica interispitivačkih razlika. Problemi u preciznosti patohistološke dijagnoze naročito su izraženi kada je u pitanju diferencijacija između KB i UK (58).

Kompjuterske tehnologije dale su veliki doprinos modernoj medicini. Poslednjih godina razvijeni su mnogi sistemi za kompjuterski potpomognutu dijagnostiku i sistemi za donošenje odluka uz pomoć kompjutera (59). Kompjuterske tehnologije povećavaju tačnost i brzinu analize uklanjajući inter- i intraspitivačke razlike (60). Ovi sistemi koriste različite medicinske signale npr. slike dobijene nuklearnom magnetnom rezonancijom, kompjuterizovanom tomografijom, ultrazvukom, ali takođe i mikrofote patohistoloških biopsija.

U kompjuterskoj analizi slika prvi korak je ekstrahovanje karakteristike od interesa. Morfometrijska, fraktalna i teksturalna GLCM (*Gray level co-occurrence matrix*) analiza često se koriste za dobijanje ovih karakteristika.

Morfometrijska analiza danas se široko primenjuje. Parametri ove kvantitativne analize pokazuju na primer koliko određeni oblik nalikuje krugu, koliko elipsi, zatim koliko je konveksan odnosno konkavan (61). Razlike u veličini i obliku ćelija i drugih entiteta mogu ukazivati na patološke promene ili se upotrebiti za klasifikaciju, npr. između KB ili UK.

Kada je fraktalna analiza u pitanju, njeni najvažniji parametri, fraktalna dimenzija (FD) i lakunarnost koriste se za određivanje kompleksnosti i heterogenosti teksture slike (62). Naime, fraktalna dimenzija meri kompleksnost mikrostruktura kriva, kontura, objekata koje ispitujuemo uključujući iregularne i nagle promene radijusa krivine konture, i parametre rasta i grananja koji nastaju kao posledica procesa multiplikacije (63). S druge strane, lakunarnost opisuje nehomogenost obrazaca i prisustvo iregularnosti u vizuelnoj teksturi (64). Lakunarnost odgovara kvadriranom koeficijentu varijacije masenog momenta proučavanog parametra, ovde raspodele piksela.

Metoda opisa teksture objekata preko osobina izračunatih iz GLC matrica, takozvana GLCM analiza, zasniva se na statistici varijacije intenziteta sivog na slici (65, 66, 67). Pritom se gledaju različiti uzajamni položaji piksela na slici. Premda je inicijalno predloženo 14 GLCM parametara (Haralick et al. 1973), u novijim istraživanjima nekad se izračunava i preko 20 različitih parametara GLCM. Ipak, pet parametara se najčešće koriste u biomedicinskim istraživanjima. To su najpre kontrast između posmatranih piksela, koji smo označili kao *contrast* – *Con*, i korelisanost bliskih, srednje udaljenih i vrlo udaljenih piksela, *correlation* – *Cor*. Zatim se veoma korisnim u mnogim slučajevima pokazao parametar nazvan ugaoni moment drugog reda (*Angular Second Moment - ASM*), poznat i kao energija (*energy* – *Eng*). To je parametar koji govori o lokalnim varijacijama intenziteta, odnosno lokalnoj homogenosti slike i osetljiv je na pravac. Na homogenost slike u celini i odsustvo bilo kakvih varijacija ukazuju visoke vrednosti inverznog momenta razlike (*inverse different moment* – *IDM*), koji se jednostavnije naziva samo homogenost (*homogeneity* – *Hom*). Entropija je mera slučajnosti u lokalnim varijacijama intenziteta piksela, koja predstavlja i meru neuređenosti i kompleksnosti slike (*entropy* – *Ent*).

Međutim, i pored jasne potrebe, u oblasti IBD, istraživanja koja koriste neku od pomenutih tehnika, odnosno morfometrijsku (68), fraktalnu (69-71) ili GLCM teksturalnu analizu (15, 72, 73), a koja bi mogla dovesti do kompjuterski potpomognute dijagnostike ove bolesti, nisu bila brojna.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti vrednosti standardnih hematoloških i biohemijskih parametara u krvi dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi dece;
2. Odrediti koncentracije sledećih 13 mikro- i makroelemenata: Na, K, Ca, Mg, Se, Fe, Zn, Cu, Mn, Cr, As, Cd, Al, u serumu i u tkivu creva dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi dece, kao i njihovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima;
3. Odrediti parametre morfometrijske, fraktalne i GLCM teksturalne analize jedara enterocita na mikrografijama histoloških preparata koje potiču sa sedam različitih segmenata tankog i debelog creva kod dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne grupe dece i njihovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima;
4. Odrediti imunohistohemijskom metodom ekspresiju parametra oksidativnog stresa 4-HNE u tkivu creva dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi i njegovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Studijski pacijenti

U ovu studiju preseka uključeni su pacijenti hospitalizovani u Univerzitetškoj dečijoj klinici u Beogradu. Uključujući kriterijumi bili su: urađena kolonoskopija zbog sumnje na zapaljenjske ili druge bolesti creva, starost ispod 18 godina. Pacijenti sa drugim hroničnim ili akutnim zapaljenjskim oboljenjima su isključeni iz studije. Pre uključivanja u istraživanje roditelji ili staratelji pacijenata su potpisali informisani pristanak. Kontrolna grupa bila su deca sa naknadno postavljenom dijagnozom iritabilnog kolona. U istraživanju je učestvovalo 20 pacijenata obolelih od KB, 18 obolelih od UK i 20 kontrola.

3.2. Protokol istraživanja

Svi predviđeni postupci su odobreni od strane Etičkog odbora Univerzitetške dečije klinike broj 017 14/32 (datum: 24. 02. 2020.) i od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 17/VI-4 (datum: 29.06.2023.). Pacijenti su razvrstani u tri grupe: kontrolna grupa pacijenata kojima je patohistološkom dijagnostikom potvrđeno da ne boluju od zapaljenjskih bolesti creva, grupa pacijenata kojoj je nakon celokupne dijagnostičke obrade dijagnostikovao ulcerozni kolitis i grupa pacijenata kojoj je nakon celokupne dijagnostičke obrade dijagnostikovana Kronova bolest. Nakon prijema pacijenata i potpisivanja informisanog pristanka, od pacijenata je uzeta potrebna količina krvi za određivanje hematoloških i biohemijskih parametara. Navedene analize su urađene standardnim metodama u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Univerzitetške dečije klinike. Pacijentima je uzeta i po jedna dodatna epruveta od 5 ml krvi iz koje će biti izdvojen serum. Serum je čuvan u zamrzivaču do transporta na Institut za tehnologiju i higijenu mesa u Beogradu, gde je određena koncentracija mikro- i makro elemenata u serumu. Za uzimanje uzoraka krvi od pacijenata korišćena je standardna oprema Univerzitetške dečije klinike. Svi pacijenti su podvrgnuti kolonoskopiji na kojoj je uzeto sedam uzoraka tkiva iz različitih segmenata tankog i debelog creva, koji se uobičajeno koriste za patohistološku dijagnostiku (terminalni ileum, cekum, ascendentni kolon, transverzalni kolon, descendentni kolon, sigmoidni kolon i rektum). Na osnovu endoskopskog nalaza u grupi pacijenata sa zapaljenjskim bolestima creva odmah nakon kolonoskopije su izračunati endoskopski indeksi aktivnosti bolesti. Indeksi aktivnosti bolesti su izračunati i na osnovu mikroskopskog pregleda tkiva koji podrazumeva patohistološku evaluaciju uzoraka tkiva obrađenih na standardan način (fiksacija u formalinu, kalupljenje u parafinu) i obojenih hematoksilin-eozin metodom. Endoskopski i patohistološki skorovi su korelirani sa drugim ispitivanim parametrima. Patohistološki preparati su zatim slikani i sa dobijenih mikrografija je ručno uklonjeno sve sem jedra. Dobijeno je 20 mikrografija koje sadrže po jedno jedro za svaki segment creva, dakle minimum 140 jedara po pacijentu. Jedra su zatim podvrgnuta morfometrijskoj, fraktalnoj i GLCM analizi pomoću *ImageJ* programa. *ImageJ*, program je razvijen u National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD). Pisan je na programskom jeziku *Java*, kako bi se osim brojnih alata za kvantitativne analize slika koje su uključili autori koda iz NIH, omogućilo da i korisnici mogu proširivati i dalje razvijati ovaj otvoreni softver u skladu sa svojim istraživanjima, a da pritom dodavanje novih alata bude jednostavno i da sve i dalje može raditi na različitim platformama. Od tkiva ukalupljenog u parafinu uzeti su isecci za imunohistohemijsku analizu. Imunohistohemijskom analizom određen je nivo oksidativnog stresa u tkivu (analiziran je jedan uzorak tkiva po pacijentu). Tokom kolonoskopije pacijentima je pored standardnih uzoraka neophodnih za patohistološku dijagnostiku uzet i po jedan dodatni uzorak svakog segmenta creva od terminalnog ileuma do rektuma (ukupno sedam uzoraka po pacijentu) težine oko 5 mg. Ovi uzorci su stavljeni u sterilne tube (*Microcentrifuge tubes with lid*, PP, 2,0 ml,

BrandGMBHandCoKG, Wertheim, Germany) i potom čuvani u zamrzivaču na -20°C do transporta na Institut za tehnologiju i higijenu mesa. Tkivo je korišćeno za određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata.

Za potrebe uzorkovanja je korišćen sterilan instrumentarijum Univerzitetske dečije klinike.

3.3. Metode

3.3.1 Određivanje hematoloških i biohemijskih parametara

Hematološke i biohemijske analize rađene su u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Univerzitetske dečije klinike. Za određivanje krvne slike sa leukocitnom formulom korišćen je hematološki analizator *CelltacEs (Nihon Kohden, Tokyo, Japan)*. Analizirani hematološki parametri i njihove merne jedinice prikazane su u Tabeli 3.3.1.1.

Tabela 3.3.1.1. Analizirani hematološki parametri i njihove merne jedinice

analizirani parametar	jedinica merenja	analizirani parametar	jedinica merenja
leukociti	10 ⁹ /l	MPV	fl
eritrociti	10 ¹² /l	PCT	%
hemoglobin	g/l	PDV	fl
MCV	fl	Trombociti	10 ⁹ /l
MCH	pg	Granulociti	10 ⁹ /l
MCHC	g/dl	monociti	10 ⁹ /l
RDW CV	%	limfociti	10 ⁹ /l

Skraćenice: MCV - *Mean corpuscular volume* - prosečna zapremina eritrocita; MCH - *Mean Corpuscular Hemoglobin* - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC - *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* - srednja koncentracija hemoglobina na decilitar eritrocita; RDW CV - *Red Cell Distribution Width Coefficient of Variation* - raspodela eritrocita po zapremini; PDV - *Platelet Distribution Width* - raspodela trombocita po zapremini; MPV - *Mean Platelet Volume* - prosečna zapremina trombocita, PCT - plateletcrit - procenat krvi koji zauzimaju trombociti.

Biohemijske analize su obavljene pomoću automatskog biohemijskog analizatora *Dimension EXL 200 (Siemens, Germany)*. Analizirani biohemijski parametri i njihove merne jedinice prikazani su u Tabeli 3.3.1.2.

Tabela 3.3.1.2. Analizirani biohemijski parametri i njihove merne jedinice

analizirani parametar	jedinica merenja	analizirani parametar	jedinica merenja
bilirubin ukupni	μmol/l	HDL - holesterol	mmol/l
bilirubin direktni	μmol/l	LDL - holesterol	mmol/l
ukupni proteini	g/l	AST	U/l
albumini	g/l	ALT	U/l
mokraćna kiselina	μmol/l	ALP	U/l
kreatinin	μmol/l	GGT	U/l
urea	mmol/l	LDH	U/l
glukoza	mmol/l	amilaza	U/l
holesterol	mmol/l	lipaza	U/l
trigliceridi	mmol/l	CRP	mg/l
magnezijum	mmol/l	fosfor	mmol/l
kreatin kinaza	U/l		

Skraćenice: HDL - *High-density lipoprotein* - lipoproteini velike gustine; LDL - *low-density lipoprotein* - lipoproteini male gustine; AST - aspartat aminotransferaza; ALT - alanin aminotransferaza; ALP - alkalna fosfataza; GGT - gama-glutamil transpeptidaza; LDH - laktat dehidrogenaza; CRP - C reaktivni protein.

Za analizu elektrolita u serumu – kalijum (mmol/l), natrijum (mmol/l), kalcijum (mmol/l), hlor (mmol/l) korišćen je sistem za analizu elektrolita AVL - 9180 (*Roshe, Germany*).

Vrednost fekalnog kalprotektina dobijena je uvidom u istorije bolesti pacijenata.

3.3.2. Endoskopija

Nakon pregleda perianalne regije kolonoskop se kroz analni otvor ubacuje do cekuma i 10 cm u terminalni ileum. Broj i mesta uzimanja uzoraka i analize koje će se sprovesti detaljno su objašnjene u protokolu studije. Odmah nakon kolonoskopije izračunati su endoskopski indeks aktivnosti KB – jednostavan endoskopski skor (*Simple Endoscopic Score* - SES-CD) i Mayo endoskopski skor za UK.

3.3.3. Patohistološka analiza

Nakon prijema, tkivni isečci su fiksirani u neutralnom puferisanom formalinu u automatskom tkivnom procesoru 24h, a zatim kalupljeni u parafinske blokove, sečeni na rezove debljine 4 μm i bojeni hematoksilin - eozin (*Bio-Optica, Milano, Italy*) metodom. Patohistološke preparate je analizirao isti patolog na mikroskopu Olympus BX41. Na osnovu patohistološkog nalaza obolelih od zapaljenjskih bolesti creva izračunati su skorovi histološke aktivnosti KB bolesti - GHAS i UK- *Geboes* skor i *Nancy. Geboes* skor podeljen je u kategorije gde njegova vrednost ≤ 2 označava remisiju, vrednosti skora >2.0 označavaju prisustvo neutrofila u lamini propriji, vrednosti >3.0 prisustvo neutrofila u epitelu, a vrednosti >4.0 destrukciju kripti.

3.3.4. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska analiza je primenjena na tkivo creva ukalupljeno u parafinu i fiksirano u formalinu. Isečci ukalupljenog tkiva debljine 4 μm su deparafinirani i hidratirani, a zatim je učinjeno povraćanje antigena indukovano toplotom u citratnom puferu (pH 6.0). *Novolink™ Polymer Detection System components (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)* je primenjen u imunohistohemijskom protokolu. Peroksidaza i proteinski blokovi su primenjeni pre inkubacije sa primarnim antitelom tokom jednog časa na sobnoj temperaturi. Analiza je izvršena primarnim antitelom (Anti-4 *Hydroxynonenal* (4-HNE), Abcam, ab46545, 1:100). Korišćeno je sekundarno antitelo iz *Novolink™ Polymer Detection System Kit (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)*. Za vizuelizaciju antigen - antitelo reakcije korišćen je 3,3'-diaminobenzidin (DAB) koji daje braon boju. Nakon imunohistohemijskog bojenja urađeno je i bojenje hematoksilin – eozinom. Negativne kontrole su dobijene korišćenjem fiziološkog rastvora puferisanog fosfatom (phosphate-buffered saline - PBS) umesto primarnog antitela. Preparati su analizirani na mikroskopu BX53 kamerom DP70 (*Olympus, Hamburg, Germany*). Analizu su obavila dva patologa nezavisno jedan od drugog i bez poznavanja kojoj grupi pripadaju uzorci.

Imunohistohemijsko skorovanje bilo je semikvantitativno. Određivan je parametar obim ekspresije na skali od 0 do 2 (0 – bez ekspresije, 1 – fokalna ekspresija, 2 – difuzna ekspresija) u epitelnim i zapaljenjskim ćelijama creva pojedinačno i u zbiru. Sabiranjem vrednosti obima ekspresije u epitelnim i zapaljenjskim ćelijama creva dobijen je parametar imunohistohemijski skor.

3.3.5. Određivanje koncentracije mikro- i makroelemenata

Priprema uzoraka i reagensa. Uzorci su do analize čuvani na temperaturi od -18°C . Zamrznuti uzorci su dan pre analize prebačeni na temperaturu $+4^{\circ}\text{C}$ radi odmrzavanja i zatim homogenizovani ultrazvučnim homogenizatorom 60 sekundi na najvećoj brzini (*Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin, Germany*). Na analitičkoj vagi preciznosti ± 0.001 g odmereno je otprilike 0.2 g odmrznutog i homogenizovanog uzorka i prebačeno u teflonski sud sistema za digestiju u mikrotalasnoj pećnici. U uzorak je zatim dodato 5ml azotne kiseline (67% *Trace Metal Grade, Fisher Scientific, Bishop, UK*), a potom i 1.5 ml hidrogen peroksida (30% *analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA*). Program u uređaju za mikrotalasnu digestiju (*Start D, Milestone, Sorisole, Italy*) se sastojao iz 3 koraka: 5 minuta

za dizanje temperature od sobne do 180 °C, zatim 10 minuta održavanja temperature na 180 °C, i konačno 20 minuta za ventilaciju i hlađenje. Nakon hlađenja digestirani rastvori koji su sadržali uzorke su kvantitativno prebačeni u flašice za jednokratnu upotrebu i razblaženi sa do 100 ml dejonizovane vode (0.063 µS) dobijene pomoću sistema za prečišćivanje (*Purelab DV35, ELGA, Buckinghamshire, UK*).

U ispitivanim uzorcima metodom masene spektrometrije na bazi induktivno-kuplovane plazme (*inductively coupled plasma mass spectrometry - ICP-MS*) (*iCap Q mass spectrometer, Thermo Scientific, Bremen, Germany*) određene su koncentracije sledećih 13 elemenata:

- Na (natrijum),
- K (kalijum),
- Ca (kalcijum),
- Mg (magnezijum),
- Se (selen),
- Fe (gvožđe),
- Zn (cink),
- Cu (bakar),
- Mn (mangan),
- Cr (hrom),
- As (arsen),
- Cd (kadmijum),
- Al (aluminijum).

Za kvantifikovanje su korišćeni izotopi koji su bili prisutni u najvećoj količini ili su izotopi selektovani na osnovu eliminacije izobaričke interferencije (npr. gvožđe). Rastvor za podešavanje (*Tune B, Thermo Scientific, Bremen, Germany*), nabavljen od proizvođača, korišćen je svakodnevno za podešavanje parametara napajanja jonske optike i elektronskog umnoživača kao i podešavanja plazme (pozicija plamenika). Na ovaj način obezbeđeno je optimizovanje mehaničkih i električnih parametara, te je mogućnost interferencije smanjena. Merni instrumenti su imali sledeće osnovne uslove rada: RF snaga (1550 W), protok gasa za hlađenje (14 l/min), protok kroz nebulizator (1 l/min), protok kolizionog gasa (1 ml/min), način rada (*Kinetic Energy Discrimination- KED*), vreme zadržavanja (10ms). Kako bi se uklonila interferencija svi izotopi su mereni u operativnom modu rada zasnovanom na diskriminaciji kinetičke energije (*Kinetic Energy Discrimination – KED*).

Standardne količine rastvora koji sadrže 1000 mg/L svakog elementa (Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Na, K, Mg, Ca, Cd and As) su nabavljeni od kompanije *Reagecon (Shannon, Co. Clare, Ireland)*. Ovi rastvori su korišćeni za pripremu standarda za kalibracione krive koje sadrže pet tačaka (uključujući i nulu). Unutrašnji standardi koji su sadržali više elemenata različite mase (⁶Li, ⁴⁵Sc, ⁷¹Ga, ⁸⁹Y, ²⁰⁹Bi) uvođeni su u sistem dodatnom linijom kroz peristaltičku pumpu tokom očitavanja svakog uzorka. Pomoću softvera za akviziciju podataka očitavane su vrednosti elemenata u uzorku i u internom standardu, te su vrednosti uzorka automatski korigovane prema vrednostima internog standarda. Svi rastvori (standardi, unutrašnji standard i uzorci) su pripremljeni u 2% azotnoj kiselini.

3.3.5.1. Potvrda kvaliteta

Kvalitet analitičkih procesa je verifikovan analizom sertifikovanih referentnih materijala NIST 1577c (*bovine liver, Gaithersburg, MD, USA*). Referentni materijali su pripremljeni na isti način kao i uzorci korišćenjem mikrotalasne digestije. Izmerene koncentracije su korigovane za faktore odgovora unutrašnjih standarda korišćenjem metoda

interpolacije. Dobijene koncentracije su bile u opsegu sertifikovanih vrednosti za sve izotope (Tabela 3.3.5.1.1.). U referentnim materijalima nije bilo informacija za Al, te su analitički povrati od 91% dobijeni analizom utvrđenih uzoraka.

Tabela 3.3.5.1.1. Verifikacija kvaliteta analitičkih procesa

Element	Sertifikovana vrednost*	Vrednost dobijena analizom**	Oporavak
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
As	19.3 \pm 1.4	20.1 \pm 1.0	104.1
Cd	97 \pm 1.4	96.0 \pm 6.8	99.0
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
Cu	275.2 \pm 4.6	271.2 \pm 12.8	98.5
Fe	197.94 \pm 0.65	196.30 \pm 8.60	99.2
Zn	181.1 \pm 1.0	178.8 \pm 17.9	98.7
Mn	10.46 \pm 0.47	10.21 \pm 1.29	97.5
Cr	53 \pm 14	51 \pm 5.0	96.0
Se	2.031 \pm 0.045	2.000 \pm 0.380	98.5
K	10230 \pm 640	10441 \pm 307	102.1
Na	2033 \pm 64	2002 \pm 170	98.5
Ca	131 \pm 10	122 \pm 10	93.1
Mg	620 \pm 42	621 \pm 47	100.2

* Sertifikovana vrednost dobijena od prodavca.

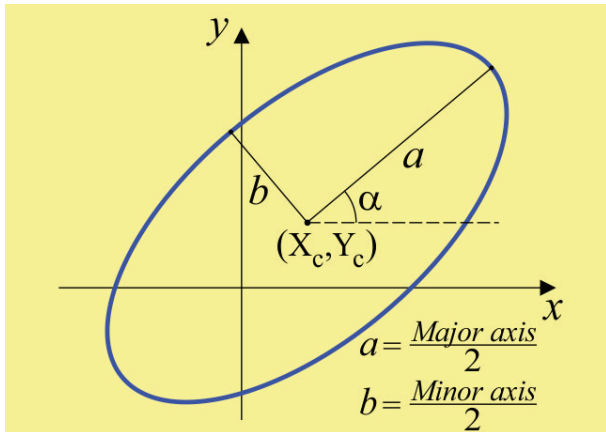
** podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

3.3.6. Priprema medicinskih slika za dalje analize

Za svaki segment creva korišćena je sledeća procedura. Četiri različita mikrografa koji sadrže najmanje po jednu kriptu creva dobijena su pomoću *Olympus DP70* foto aparata (*Olympus BX50, Tokyo, Japan*) i *Analysis 5.0* softvera (*SoftImaging System, Olympus*). Ukupno uveličanje dobijeno korišćenjem mikroskopa bilo je 1000 puta. Slike su čuvane u TIFF formatu dimenzija 4080 \times 3072 piksela, rezolucije 200 DPI, dubine bita od 24. Korišćenjem funkcije za selektovanje poligona *ImageJ* softvera (*NIH, Bethesda, MD, USA*) izdvojeno je 20 ćelijskih jedara po segmentu za svakog pacijenta. Svako jedro je zatim prebačeno na belu podlogu dimenzija 500 x 500 piksela. Ovi mikrografi su konvertovani u monohromatske mikrografe korišćenjem *ImageJ* dodatka za dekonvoluciju boja korišćenjem opcije nazvane H&E 2 (za jedro je dominantna hematoksilinska komponenta (R: 0.49015734, G: 0.76897085, B: 0.41040173)), a zatim prevedeni u 8-bitne slike (*grayscale*) i kao takvi čuvani za dalje analize.

3.3.7. Morfometrijska analiza mikrografija

Morfologija jedara je analizirana putem *ImageJ* softvera. Jedra su automatski segmentovana pomoću klika *Wand tool* na konturu jedra. U sledećem koraku korišćenjem funkcije "*Measure*" izmereni su sledeći morfometrijski deskriptori, odnosno parametri jedara : obim i površina jedra, parametri elipse koja najbolje opisuje oblik jedra (x_C , y_C , a , b , α) (Slika 3.3.7.1) i deskriptori oblika konture - cirkularnost, koeficijent aspekta (*aspect ratio* - AR), zaobljenost i solidnost. (Ovi parametri su u softveru prethodno selektovani za analizu.) Neki od parametara delimično koreliraju te nisu korišćeni istovremeno. Parametri elipse koja najbolje opisuje oblik jedra su pozicija centra (x_C , y_C), velika poluosa elipse, a , mala poluosa elipse, b , i azimutalni ugao velike poluose, α .



Slika 3.3.7.1. Prikaz parametara elipse.

Cirkularnost meri nivo sličnosti nekog oblika sa kružnicom, a računa se prema formuli:

$$\text{Cirkularnost} = 4\pi \times \frac{\text{Area}}{(\text{Perimetar})^2} \quad (1)$$

Cirkularnost savršenog kruga iznosi 1. Kada su kvadrat, pravougaonik i izduženi oblici u pitanju ova vrednost sve više odstupa od jedinice sve se više približavajući 0.

Koeficijent aspekta predstavlja odnos glavne prema maloj osi elipse, a njegovom inverzijom dobija se zaobljenost. Ovi parametri ne uključuju potencijalne kvržice kontura.

$$AR = \frac{a}{b}, \text{ Zaobljenost} = \frac{4 \times \text{Area}}{\pi \times a^2} = \frac{1}{AR} \quad (2)$$

I na kraju, solidnost predstavlja odnos površine ispitivanog objekta i oko njega opisanog konveksnog objekta (koji ga u potpunosti obuhvata):

$$\text{Solidnost} = \frac{\text{Area}}{\text{Konveksna area}} \quad (3)$$

3.3.8. Izdvajanje teksture hromatina segmentacijom lokalnim postavljanjem praga

Pre pristupanja fraktalnoj analizi svaka slika je binarizovana, tako što je izvršeno izdvajanje odnosno segmentacija teksture hromatina na tamne i svetle regije. Kako bi se ostvario najbolji rezultat u uslovima blage varijacije osvetljenosti različitih delova mikrografije, korišćena je segmentacija lokalnim postavljanjem praga (*local auto thresholding*). Nakon upoređivanja nekoliko metoda izabrana je *Niblack* metoda za lokalno postavljanje praga. Lokalna vrednost praga za svaki piksel je izračunata prema okolini piksela sumiranjem srednje vrednosti intenziteta sivog susednih piksela sa skaliranom standardnom devijacijom intenziteta sivog u okruženju posmatranog piksela. Promer veličine okruženja i težinski koeficijent za skaliranje moraju biti određeni empirijski, prema podacima koji se analiziraju. Standardne (default) vrednosti težinskog koeficijenta su 0,2 za svetle objekte na tamnoj pozadini i -0,2 za tamne objekte na svetloj pozadini. Kako su se ove vrednosti dobro pokazale u našem slučaju, ostale su nepromenjene. Prozor lokalnog okruženja radijusa $w = 6$ px, izabran empirijski, centriran je oko svakog pojedinačnog piksela. Lokalni prag oko svakog piksela zatim je izračunat prema formuli:

$$t_{Ni} = \mu(w) - 0.2 \cdot \sigma(w) \quad (4)$$

U ovoj jednačini $\mu(w)$ i $\sigma(w)$ predstavljaju aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju intenziteta sivog u okviru lokalnog okruženja veličine w . Tako da svaki piksel ima svoj prag koji se zasniva na vrednosti intenziteta sivog okolnih piksela (74). Na ovaj način bolje je izdvojena prostorna raspodela dva tipa hromatina: euhromatina (svetliji) i heterohromatina (tamniji) (75). Dosadašnja istraživanja ukazuju da se izmenjena prostorna raspodela tamnijih i svetlijih regija strukture hromatina pre svega makroskopski ogleda kroz promene u teksturi jedra.

3.3.9. Fraktalna analiza mikrografija

Fraktalna analiza je urađena na mikrografijama jedara na kojima je prethodno primenjeno gore opisano *Niblack* automatsko lokalno postavljanje praga, nakon čega je slika pretvorena u binarni (crno/beli) format. Za fraktalnu analizu je korišćen slobodno dostupan *FracLac plugin* za *ImageJ* softver (razvijen od strane A. Karperien, *Charles Sturt University, Australia*). Fraktalna dimenzija (D_b) izračunata je metodom brojanja kućica (box counting) i metodom zasnovanom na verovatnoći nalaženja piksela u pojedinoj kućici određene veličine, što se još naziva masom (*mass-based method*). Rezultati dobijeni putem obe metode su se slagali za iste parove mreža. Veličine kućica u preliminarnim merenjima su bile sledeće: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 23, 27, 30, 35, 40, 46, 52. Kako se ovo podešavanje pokazalo dobrim, sve slike su obrađene na identičan način, korišćenjem *Scaled Series 7/8* i veličine kućica koje su date iznad (korišćene u obe metode). Dakle, ovakvim podešavanjem *Scaled Series* veličina kućice se uvek povećavala otprilike za jednu osminu što je omogućavalo da podaci na regresionoj liniji budu pravilno raspoređeni. U cilju izbegavanja efekata pozicioniranja mreža na rezultate korišćeno je 12 nasumično pozicioniranih mreža na svakoj slici i rezultati svih 12 proračuna su usrednjeni. Fraktalna dimenzija je izračunata i pomoću metode zasnovane na masi, a ista metoda poslužila je i za izračunavanje lakunarnosti.

Promena u broju nepraznih kućica u mreži, $N(\varepsilon)$, sa promenom veličine kućice modelovana je regresionom linijom koja se najbolje uklapala u smislu da daje najmanje srednjekvadratno odstupanje. Nagib ove linije je iskorišćen za dobijanje D_b .

$$D_b = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N(\varepsilon)}{\ln \varepsilon} \quad (5)$$

Metod zasnovan na verovatnoći nalaženja piksela u pojedinoj kućici određene veličine procenjuje verovatnoću pronalaženja m piksela u kućici veličine ε , $P(m, \varepsilon)$, brojanjem piksela u kućicama i normalizovanjem dobijenog broja piksela da daju totalnu verovatnoću jedan, $\sum_m P(m, \varepsilon) = 1$.

Moment mase prvog reda $M(\varepsilon)$ i moment mase drugog reda $M^2(\varepsilon)$ su dobijeni prema formulama:

$$M(\varepsilon) = \sum_m mP(m, \varepsilon), M^2(\varepsilon) = \sum_m m^2 P(m, \varepsilon) \quad (6)$$

Fraktalna dimenzija se zatim računa na osnovu $(\varepsilon, M(\varepsilon))$ podataka prema formuli:

$$D_m = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln M(\varepsilon)}{\ln \varepsilon} \quad (7)$$

U oba slučaja adekvatnost regresione linije se procenjivala na osnovu koeficijenta korelacije, r^2 . Ovaj koeficijent bio je blizu jedinice, što znači da su podaci bili skoro linearno raspoređeni, tj. visoka je preciznost procene fraktalne dimenzije. Lakunarnost je dobijena iz masenog momenta prvog i drugog reda prema sledećim formulama:

$$\lambda(\varepsilon) = \frac{\langle M^2(\varepsilon) \rangle - (M(\varepsilon))^2}{(M(\varepsilon))^2}, \quad \bar{\lambda} = \langle \lambda(\varepsilon) \rangle. \quad (8)$$

3.3.10. GLCM analiza mikrografija

GLCM analiza služi za statistički opis teksture slike. GLCM je skraćenica od „gray level co-occurrence matrix“, radi se o matrici združenog pojavljivanja posmatranih nivoa sive nijanse pod određenim uglom i na određenom rastojanju. Ne posmatra se svaka nijansa sive ponaosob, već se grupišu susedne nijanse tako da se ukupno ima određeni broj nivoa, u našem slučaju 16 različitih nivoa, grupa nijansi sive boje. GLCM matrica u našem slučaju je imala 16 vrsta i 16 kolona, znači onoliko koliko nivoa sive razmatramo. Za svaka dva piksela

jedra između kojih pod posmatranim uglom postoji traženo rastojanje (1 px, 2px, ... , 10 px, itd.) registruju se nivo sive prvog na osnovu koga se odredi kolona GLC matrice i nivo sive druge tačke koji određuje vrstu GLC matrice i unos koji odgovara toj vrsti i toj koloni inkrementira se za jedan. Sinteza GLC matrice je obavljena pomoću procedura iskodiranih na osnovu metoda opisanih u originalnom radu Haralick et al. 1973 (76). Originalni kod je modifikovan kako bi se omogućilo odbacivanje piksela koji ne pripadaju jedru (77). Četiri razmatrana pravca u našem slučaju su bili horizontalni (razmak tačaka), vertikalni, dijagonalni pod uglom od 45° i dijagonalni pod uglom od 135° ($\theta=0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, \text{odnosno } 135^\circ$). Osobine tekstura nisu značajno zavisile od pravca razmaknutosti tačaka, te je nakon proračuna statističkih osobina tekstura izvršeno usrednjavanje. Analizirali smo slučaj dva susedna piksela, rastojanja od 5 px koje odgovara umereno udaljenim tačkama i rastojanja od 25 px, gde je posmatrana korelisanost i ostali statistički parametri dalekih tačaka posmatrane teksture. Dakle, rezultati GLCM analize sumiraju koliko se često dva piksela određenih nivoa intenziteta sivog, među kojima je udaljenost od d piksela, nalaze u istom prostornom rasporedu (76).

Nakon normalizacije, GLCM analiza se koristi za izračunavanje većeg broja statističkih mera (parametara). U ovoj tezi izračunata su četiri parametra koji se najčešće koriste: kontrast, korelacija, ugaoni moment drugog reda, odnosno energija, i homogenost.

Kontrast, mera varijacija nivoa sivog za par (θ, d) računa se prema formuli

$$\text{Kontrast} = \sum_{n=0}^{Ng-1} n^2 \left\{ \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i, j) \Big|_{|i-j|=n} \right\}. \quad (9)$$

Mera linearne zavisnosti nivoa sivog, u slučaju susednih, bliskih, ili udaljenih tačaka na nekoj slici, predstavlja korelaciju. Najčešće pikseli koji se nalaze jedni do drugih koreliraju, međutim korelacija srednje udaljenih piksela već govori više o analiziranoj teksturi. U formuli μ predstavlja aritmetičku sredinu, a σ standardnu devijaciju.

$$\text{Korelacija} = \frac{\sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} (i-\mu_i)(j-\mu_j)p(i, j)}{\sigma_i \sigma_j}. \quad (10)$$

Ugaoni moment drugog reda (*ASM*) je mera lokalne teksturalne jednodličnosti. Visok *ASM* znači da postoji manji broj izrazito izraženih promena u nivou sivog, dok bi male varijacije prisutne svuda u teksturi dale niži *ASM*. Ovaj parametar računa se prema formuli:

$$\text{ASM} = \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i, j)^2. \quad (11)$$

Što se tiče parametra Homogenost, kada slika u celini ima malo varijacija, koeficijenti visoke težine se primenjuju na GLCM dijagonalu i homogenost slike je visoka. Ukoliko varijacije ne postoje, vrednost ovog parametra je 1. Računa se prema sledećoj formuli:

$$\text{Homogenost} = \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} \frac{p(i, j)}{1+|i-j|}. \quad (12)$$

3.4. Statistička analiza

Za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za analizu povezanosti. Zavisno od tipa varijabli i normalnosti raspodele, deskripcija podataka je prikazivana kao n (%), aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) ili medijana (min-max). Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćene su: t-test, hi-kvadrat test, Analiza varijanse, *Mann-Whitney* test, *Kruskal-Wallis* test. Od metoda za analizu povezanosti primenjen je Spirmanov koeficijent korelacije rangova. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Svi podaci su obrađeni u IBM SPSS Statistics 22 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) softverskom paketu.

4. REZULTATI

Nakon istraživanja sprovedenog na deci oboleloj od IBD (KB i UK) i kontrolnoj grupi dece dobijeni su rezultati koji su sistematično predstavljeni u poglavljima koja slede.

4.1. Klinički, hematološki i biohemijski parametri

Rezultati poređenja kliničkih, hematoloških i biohemijskih parametara između ispitivanih grupa (Kontrola, UK i KB) prikazani su u tabelama 4.1.1. i 4.1.2. Gledano prema percentilima težine, deca obolela od KB i UK imala su statistički značajno manju telesnu masu za uzrast u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0.018$, $p=0.062$), dok niže vrednosti visine (percentili) u bolesničkim grupama nisu dale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Čelije krvi eritrociti, granulociti i trombociti imale su statistički značajno više vrednosti kod obolelih od KB u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0.005$, $p=0.044$, $p=0.034$), a kada su eritrociti u pitanju i u odnosu na UK ($p=0.047$). Prema vrednosti MPV trombociti obolelih od KB bili su statistički značajno manji u odnosu na obolele od UK ($p=0.042$), a obolelih od UK imali su niži MCHC indeks u odnosu na kontrole ($p=0.049$). Većina ispitivanih biohemijskih parametara nije se statistički značajno razlikovala među grupama. S druge strane, pokazane su statistički značajne razlike u koncentraciji albumina, kreatin kinaze, CRP, ukupnog i HDL holesterola u serumu i kalprotektina u fecesu ($p<0.001$, $p=0.041$, $p<0.001$, $p=0.014$, $p=0.032$, $p<0.001$). Albumini i ukupni holesterol bili su statistički značajno niži, a fekalni kalprotektin viši kod obolelih od UK ($p=0.028$, $p=0.032$, $p=0.001$) i KB ($p<0.001$, $p=0.040$, $p=0.001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajna razlika među grupama u vrednostima CRP i HDL holesterola postojala je samo između KB grupe i kontrole ($p<0.001$, $p=0.040$), pri čemu je CRP bio viši, a HDL holesterol niži u obolelih od KB. Vrednosti kreatin kinaze bile su najviše u obolelih od UK, a najniže kod obolelih od KB, a ova razlika u poređenju između grupa pokazala je trend veoma blizu statističke značajnosti ($p=0.057$).

Tabela 4.1.1. Poređenje kliničkih i hematoloških parametara između ispitivanih grupa (Kontrola, UK i KB)

	Kontrola	UK	KB	p
Pol				$p=0.124^{\ddagger}$
muški	45%	50%	75%	
ženski	55%	50%	25%	
Starost u godinama	12.25 (2.50-17.75)	13.58 (5.83-17.83)	13.95 (4.25-18)	$p=0.498^{\S}$
PUCAI/PCDAI		35±13.93	19.57±7.59	
SES-CD skor			9 (3-22)	
GHAS/Nancy (kolon)		3 (2-4)	9.55±2.6	
GHAS (terminalni ileum)			6.16±4.2	
Geboes skor		4 (2-4)		
BMI	19.70 (13.5-42)	18.20 (12.8-26.6)	17.5 (13.8-27.90)	$p=0.549^{\S}$
Masa za uzrast (%il)	82(7-100)	51(0-98)	56(7-96)	$p=0.013^{\S}$ UK-KB $p=1.000$ KO-UK $p=0.062$ KO-KB $p=0.018$
Visina za uzrast (%il)	78±19.99	61.82±31.58	61.37±28.87	$p=0.129^{\ddagger}$
Leukociti ($10^9/l$)	6.45 (4.4-17.1)	7.6 (4-18.1)	9.4 (3.9-14.8)	$p=0.202^{\S}$
Limfociti ($10^9/l$)	2.4±0.64	2.28±0.73	1.96±0.81	$p=0.154^{\ddagger}$
Monociti ($10^9/l$)	0.4 (0.1-0.9)	0.3 (0.1-1.2)	0.5 (0.1-1.2)	$p=0.221^{\S}$
Granulociti ($10^9/l$)	3.05 (1.9-15.3)	4.65 (2.2-13.2)	6.15 (1.4-11.9)	$p=0.050^{\S}$ UK-KB $p=0.815$ KO-UK $p=0.574$ KO-KB $p=0.044$
Eritrociti ($10^{12}/l$)	4.62±0.33	4.73±0.39	5.06±0.51	$p=0.005^{\ddagger}$ UK-KB $p=0.047$ KO-UK $p=0.713$ KO-KB $p=0.005$
Hemoglobin (g/l)	133 (93-146)	130(83-176)	130.5(101-157)	$p=0.677^{\S}$
Hematokrit (%)	37.79±3.46	37.67±5.77	39.34±4.16	$p=0.439^{\ddagger}$
MCV (fl)	83.80 (69.1-89.4)	81.7 (60.9-89.2)	77.95 (65.1-92.3)	$p=0.369^{\S}$
MCH (pg)	28.25±2.72	26.66±3.51	26.33±3.13	$p=0.127^{\ddagger}$
MCHC (g/l)	345.9±14.8	332.39±23.32	336.65±12.40	$p=0.053^{\ddagger}$ UK-KB $p=0.728$ KO-UK $p=0.049$ KO-KB $p=0.215$
RDW - CV (%)	13 (11.6-16.6)	12.65 (11-17.3)	14.05 (11.9-17.6)	$p=0.114^{\S}$
Trombociti (10^9)	265 (188-194)	311 (213-773)	364 (193-522)	$p=0.038^{\S}$ UK-KB $p=1.000$ KO-UK $p=0.375$ KO-KB $p=0.034$
MPV (fl)	7.7 (5.9-10.4)	7.85 (6.8-10.4)	7.10 (5.7-8.4)	$p=0.035^{\S}$ UK-KB $p=0.042$ KO-UK $p=1.000$ KO-KB $p=0.166$
PCT (%)	0.21 (0.14-0.37)	0.245 (0.17-0.52)	0.26 (0.16-0.36)	$p=0.095^{\S}$
PDW (fl)	16.80 (11.7-18.3)	17.00 (13.3-18.8)	16.75 (13.1-19.0)	$p=0.472^{\S}$

UK - ulcerozni kolitis; KB – Kronova bolest; PUCAI - *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index* – pedijatrijski indeks aktivnosti ulceroznog kolitisa; PCDAI - *Pediatric Crohn's Disease Activity Index* – pedijatrijski indeks aktivnosti Kronove bolesti; SES-CD; GHAS - *Global Histological Activity Score* - globalni skor histološke aktivnosti; BMI - *Body Mass Index* - indeks telesne mase; Masa za uzrast (%ile)- masa za uzrast u percentilima; Visina za uzrast (%ile)– Visina za uzrast u percentilima : MCV -*Mean Corpuscular Volume* - prosečna zapremina eritrocita; MCH - *Mean Corpuscular Hemoglobin* - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC - *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* - srednja koncentracija hemoglobina na decilitar eritrocita; RDW CV - *Red Cell Distribution Width Coefficient of Variation* - raspodela eritrocita po zapremini; PDW - *Platelet Distribution Width* - raspodela trombocita po zapremini; MPV - *Mean Platelet Volume* - prosečna zapremina trombocita, PCT - *plateletcrit* - procenat krvi koji zauzimaju trombociti; \ddagger One way ANOVA (Post hoc Tukey Test); \S Kruskal–Wallis test; ‡ Hi-kvadrat test.

Tabela 4.1.2. Poređenje biohemijskih parametara između ispitivanih grupa (Kontrola, UK i KB)

Varijabla	Kontrola	UK	KB	<i>p</i>
Glukoza (mmol/l)	5.05 (4.2-6.1)	5.4 (3.9-9.7)	5 (3.8-8.6)	<i>p</i> =0.169 [§]
Urea (mmol/l)	4.19±1.41	3.81±1.19	3.64±1.01	<i>p</i> =0.396 [¥]
Kreatinin (µmol/l)	53.25±15.39	58.94±19.28	60.50±16.85	<i>p</i> =0.388 [¥]
Proteini (g/l)	76.28±3.91	74.56±5.76	76.25±7.04	<i>p</i> =0.589 [¥]
AST (U/l)	23 (10-46)	20 (13-58)	20 (9-74)	<i>p</i> =0.734 [§]
ALT (U/l)	28 (20-92)	40 (19-145)	31.5 (20-87)	<i>p</i> =0.238 [§]
Bilirubin ukupni (µmol/l)	6.9 (3.3-27.8)	7.2 (2.5-19.9)	7.3 (3.8-14.3)	<i>p</i> =0.541 [§]
Bilirubin direktni (µmol/l)	2.6 (1.1-5.8)	2.15 (0.8-3.5)	2.05 (1.2-3.5)	<i>p</i> =0.339 [§]
Mokraćna kiselina (µmol/l)	245±61.13	283±58.06	298±94.9	<i>p</i> =0.080 [¥]
Serumski kalijum (mmol/l)	4.52±0.30	4.41±0.35	4.33±0.35	<i>p</i> =0.199 [¥]
Serumski natrijum (mmol/l)	138 (135-140)	138 (130-141)	137 (133-142)	<i>p</i> =0.216 [§]
Serumski hlor (mmol/l)	103 (99-106)	102 (100-107)	101 (97-106)	<i>p</i> =0.519 [§]
Serum. magnezijum (mmol/l)	0.87±0.07	0.84±0.07	0.87±0.11	<i>p</i> =0.533 [¥]
Serumski kalcijum (mmol/l)	2.41 (2.27-4.40)	2.33 (2.11-2.53)	2.39 (2.08-2.56)	<i>p</i> =0.052 [§]
Alkalna fosfataza (U/l)	132 (51-381)	120 (47-493)	127 (69-486)	<i>p</i> =0.924 [§]
Fosfor (mmol/l)	1.47±0.19	1.55±0.164	1.52±0.22	<i>p</i> =0.537 [¥]
Amilaza (U/l)	60.5 (28-130)	49.00 (35-90)	49.5 (23-153)	<i>p</i> =0.330 [§]
Albumini (g/l)	43 (38-48)	39.5 (24-45)	37 (28-45)	<i>p</i><0.0001[§] UK-KB <i>p</i> =0.096 KO-UK <i>p</i>=0.028 KO-KB <i>p</i><0.0001
GGT (U/l)	16 (13-123)	19 (13-59)	21 (14-221)	<i>p</i> =0.066 [§]
LDH (U/l)	171.95±32.73	172.41±36.69	149.15±31.5	<i>p</i> =0.057 [¥]
Kreatin kinaza (U/l)	78.5 (33-320)	98.5(13-277)	45 (21-313)	<i>p</i>=0.041[§] UK-KB <i>p</i> =0.057 KO-UK <i>p</i> =1.000 KO-KB <i>p</i> =0.148
Lipaza (U/l)	90 (53-283)	58(21-161)	83(29-555)	<i>p</i> =0.145 [§]
CRP (mg/l)	1.05 (0-11)	1.55 (1-13)	15.5(1-91)	<i>p</i><0.0001[§] UK-KB <i>p</i> =0.550 KO-UK <i>p</i> =0.240; KO-KB <i>p</i><0.0001
Fekalni Kalprotektin (µg/g)	69.9(12-1400)	1001(249-9000)	1001(189-2001)	<i>p</i><0.0001[§] UK-KB <i>p</i> =1.000 KO-UK <i>p</i>=0.001 KO-KB <i>p</i>=0.001
Holesterol (mmol/l)	4.46±0.61	3.72±0.54	3.75±1.0	<i>p</i>=0.014[¥] UK-KB <i>p</i> =0.993 KO-UK <i>p</i>=0.032 KO-KB <i>p</i>=0.026
LDL holesterol (mmol/l)	2.51±0.70	2.00±0.47	2.05±0.85	<i>p</i> =0.095 [¥]

HDL holesterol (mmol/l)	1.60±0.39	1.36±0.24	1.32±0.38	p=0.032[¥] UK-KB p=0.968 KO-UK p=0.090; KO-KB p=0.040
Trigliceridi (mmol/l)	0.66 (0.16-2.14)	0.82 (0.36-1.48)	0.72 (0.33-1.84)	p=0.869 [§]

Skraćenice: KB – Kronova bolest; UK – ulcerozni kolitis; HDL - High-density lipoprotein - lipoproteini velike gustine; LDL - low-density lipoprotein - lipoproteini male gustine; AST - aspartat aminotransferaza; ALT - alanin aminotransferaza; GGT - gama-glutamil transpeptidaza; LDH - laktat dehidrogenaza; CRP – C reaktivni protein; ¥One Way ANOVA (*Post hoc Tukey Test*); § *Kruskal–Wallis test*.

Korelacija SES-CD indeksa sa kliničkim, hematološkim parametrima prikazana je u tabeli 4.1.3. Ukupni *Nancy* indeks korelirao je sa HDL ($rs=0.598$, $p=0.024$) i PUCAI ($rs=-0.499$, $p=0.035$), a ukupni *Geboes* sa HDL ($rs=0.548$, $p=0.042$). Vrednosti GHAS indeksa u terminalnom ileumu negativno su korelirale sa albuminima ($rs=-0.509$, $p=0.026$), a u kolonu sa MCHC indeksom ($rs=-0.447$, $p=0.048$).

Tabela 4.1.3. Korelacija SES-CD indeksa sa kliničkim, hematološkim i biohemijskim parametrima

	<i>rs</i>	<i>p</i>
Granulociti	$rs=0.569$	$p=0.009$
Trombociti	$rs=0.448$	$p=0.047$
CRP	$rs=0.559$	$p=0.016$
Fekalni kalprotektin	$rs=0.495$	$p=0.026$
HDL holesterol	$rs=-0.579$	$p=0.015$
Ukupni holesterol	$rs=-0.751$	$p<0.0001$
PCDAI	$rs=0.540$	$p=0.014$

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. CRP – C reaktivni protein; HDL - High-density lipoprotein - lipoproteini velike gustine; ; PCDAI - *Pediatric Crohn's Disease Activity Index* – pedijatrijski indeks aktivnosti Kronove bolesti; *rs* - Spirmanov koeficijent korelacije rangova

4.2. Mikro- i makro elementi

Koncentracija oligoelemenata u serumu i tkivu creva dece obolele od IBD

U ovom delu istraživanja obrađeni su uzorci seruma i tkiva creva 17 pedijatrijskih pacijenata sa dijagnozom IBD (10 KB i 7 UK), dok je kontrolnu grupu činilo 10 dece. Karakteristike pacijenata i kontrola prikazane su u tabeli 4.2.1. Pacijenti su generalno imali manju masu za uzrast (izraženo u percentilima) (ukupno $p=0.025$), bili su niži rastom i imali su niži indeks telesne mase (*Body Mass Index*-BMI) u odnosu na kontrolnu grupu dece. Albumini su bili sniženi u grupi pacijenata u odnosu na kontrole (ukupno $p=0.020$), dok su srednje vrednosti hemoglobina bile u granicama normale u svim grupama. Kada su parametri koji pokazuju zapaljenje u pitanju, iako je CRP bio viši u KB grupi u odnosu na ostale, statistička značajnost nije pokazana. S druge strane, vrednosti fekalnog kalprotektina bile su statistički značajno veće u obe grupe pacijenata (ukupno $p<0.001$).

Poređenje oligoelemenata u serumu dece obolele od IBD (podaci za KB i UK su prikazani i odvojeno) i kontrola prikazani su u tabelama 4.2.2 i 4.2.3. Serumski bakar, gvožđe i mangan pokazali su značajne razlike (ukupno $p=0.038$, $p=0.001$, $p=0.010$). Nadalje, u poređenju među podgrupama (KB, UK i kontrole) serumsko gvožđe je bilo sniženo kod dece sa dijagnozom KB u odnosu na kontrole ($p=0.001$). Međutim, serumski bakar koji je takođe bio najviši kod KB pacijenata nije pokazao statističku značajnost u poređenju između podgrupa, mada je razlika između KB i UK grupe bila veoma blizu granice statističke značajnosti (KB poređeno sa UK $p=0.056$). Značajna razlika u serumskom manganu nastala

je između UK i KB grupe ($p=0.010$), a vrednost ovog elementa u serumu bila je najviša kod dece obolele od UK. Rezultati ove teze jasno ukazuju da je vrednost selena u serumu bila niža kod UK u odnosu na ostale grupe, ali na ovom broju pacijenata statistička značajnost se nije mogla pokazati ($p=0.075$). Serumsko gvožđe bilo je značajno niže u IBD grupi u odnosu na kontrolnu, dok se drugi ispitivani oligoelementi nisu razlikovali između ove dve grupe. Od ispitivanih toksičnih metala jedini koji je bio detektovan u serumu je kadmijum, ali njegove vrednosti nisu se razlikovale među grupama.

Tabela 4.2.1. Kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivanih pacijenata

Varijabla	Kontrolna grupa	UK	KB	ukupno p
Pol				
muški	40%	85.7%	70%	0.128 ^f
ženski	60%	14.3%	30%	
Godine	12.1±4.0	15.2±2.2	11.6± 5.7	0.230 [¥]
PUCAI		30 (0-60)		
PCDAI			17.50 (10 - 25)	
Hemoglobin	132.6±10.9	136.0± 30.2	132.6±14.0	0.917 [¥]
Leukociti	5.6 (4.4-17.1)	7.6 (4.0-11.6)	8.5 (3.9-12.2)	0.533 [§]
CRP	1.1 (0-11)	1.4 (1-6)	14.8 (1-59)	0.296 [§]
Fekalni kalprotektin	43.0 (14 - 467)	789.0 (249 - 1447)	987.8 (189 - 2001)	<0.001 [§]
Albumini	43.0±1.9	41.0±2.0	37.2±4.5	0.020 [¥]
BMI	21.8±6.6	19.5±3.9	17.3±3.2	0.174 [¥]
Masa za uzrast (%il)	77.9 (35 - 100)	45.7 (14 - 98)	40.8 (9 - 61)	0.025 [§]
Visina za uzrast (%il)	78.6 (44 - 95)	62.7 (24 - 96)	56.3 (11 - 102)	0.314 [§]

značajne p vrednosti su podebljane Skraćenice: KB- Kronova bolest; UK- Ulcerozni kolitis; PUCAI- Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index; PCDAI- Pediatric Crohn's Disease Activity Index; CRP – C reaktivni protein (C Reactive Protein); BMI- indeks telesne mase (Body Mass Index); Masa za uzrast (%ile)- masa za uzrast u percentilima; Visina za uzrast (%ile)– Visina za uzrast u percentilima. ¥One Way ANOVA (Post hoc Tukey Test), § Kruskal–Wallis test, ^fHi-kvadrat test.

Tabela 4.2.2. Koncentracija esencijalnih oligoelemenata u trenutku postavljanja dijagnoze u serumu, tkivu terminalnog ileuma i kolona kod dece obolele od IBD, KB i UK i kontrola

Varijabla	Serum	Ileum	Kolon
Na mg/kg	$p1=0.956$	$p1=0.510$	$p1=0.268$
	$p2=0.592$	$p2=0.647$	$p2=0.483$
Kontrola	3920.8 (3682.4-4809.8)	2204.0 (1394.0-4477.0)	2657.0 (1762.2 -3210.7)
IBD	3978.0 (3231.95 – 4699.9)	2228.1 (272.6 – 3046.5)	2903.8 (885.10 – 4562.5)
UK	3797.0 (3231 – 4699.9)	2213.2 (272.6-2877.0)	3001.5 (1535.6 – 4562.5)
KB	3990.1 (3437.8 – 4649.5)	2243.0 (299.0 –3046.0)	2806.0 (885.10 – 4195.3)
Mg mg/kg	$p1=0.618$	$p1=0.021$	$p1=0.155$
	$p2=0.589$	$p2=0.054$	$p2=0.339$
Kontrola	22.5 (18.9 – 29.3)	429.1 (131.7 – 907.6)	535.02 (189.3 – 1108.1)
IBD	22.5 (18.4 – 29.1)	238.0 (15.9 – 467.6)	354.6 (16.75 – 1309.3)
UK	21.0 (18.4– 26.7)	221.2 (18.7 – 371.9)	278.9 (191.8 – 675.1)
KB	23.0 (19.8 - 29.1)	377.1 (15.9 – 467.6)	429.7 (16.8 – 1309.3)

K mg/kg	$p_1=0.471$ $p_2=0.097$	$p_1=0.065$ $p_2=0.165$	$p_1=0.958$ $p_2=0.966$
Kontrolle	175.4 (164.2 – 219.1)	5421.8 (1690.2 – 10101.5)	4375.1 (2728.4 – 8367.5)
IBD	177.5 (138.0 – 219.1)	4370.7 (116.6 – 10101.5)	44976.2 (166.4 – 9670.8)
UK	157.6 (138.0 – 200.9)	3680.9 (373.9 – 4410.7)	4122.0 (2177.0 – 9670.8)
KB	178.3 (166.5 – 210.6)	2449.5 (116.6 – 6521.4)	5830.3 (166.4 – 8663.7)
Ca mg/kg	$p_1=0.160$ $p_2=0.264$	$p_1=0.075$ $p_2=0.170$	$p_1=0.429$ $p_2=0.732$
Kontrolle	105.2 (92.2 – 108.7)	346.35 (174.2 – 989.6)	358.2 (219.7 – 1143.9)
IBD	95.3 (84.2 – 119.6)	262.6 (13.7 – 764.5)	302.4 (32 – 1161.8)
UK	95.3 (84.2 – 111.1)	279.7 (13.7 – 764.5)	319.9 (148.7 – 1161.8)
KB	98.7 (93.2 – 119.6)	228.7 (43.7 – 321.6)	360.0 (32.0 – 1893.3)
Mn mg/kg	$p_1=0.387$ $p_2=0.010^{a1}$	$p_1=0.007$ $p_2=0.024^{a2}$	$p_1=0.317$ $p_2=0.595$
Kontrolle	0.001 (<0.001 – 0.003)	1.95 (0.96 – 6.22)	1.14 (0.80 – 2.73)
IBD	0.001 (<0.001 – 0.006)	1.03 (0.19 – 1.80)	0.97 (0.16 – 4.53)
UK	0.002 (<0.001 – 0.006)	1.32 (0.19 – 1.65)	0.83 (0.63 – 3.86)
KB	<0.001 (<0.001 – 0.001)	0.88 (0.24 – 1.80)	1.11 (0.16 – 4.53)
Fe mg/kg	$p_1=0.004$ $p_2=0.001^b$	$p_1=0.598$ $p_2=0.663$	$p_1=0.493$ $p_2=0.746$
Kontrolle	1.200 (0.389 – 2.256)	39.40 (20.21 – 69.50)	31.10 (16.37 – 74.06)
IBD	0.600 (0.003 – 1.408)	32.1 (3.68 – 150.82)	42.2 (16.47 – 62.78)
UK	0.800 (0.565 – 1.408)	30.1 (3.58 – 150.82)	42.5 (18.91 – 54.13)
KB	0.400 (0.003 – 0.653)	52.3 (10.98 – 79.20)	41.8 (16.47 – 62.78)
Cu mg/kg	$p_1=0.318$ $p_2=0.038^c$	$p_1=0.017$ $p_2=0.055$	$p_1=0.140$ $p_2=0.335$
Kontrolle	1.000 (0.689 – 1.349)	4.1 (1.75 – 10.21)	4.1 (2.84 – 8.00)
IBD	1.100 (0.762 – 2.451)	3.0 (0.36 – 10.21)	3.3 (1.12 – 7.22)
UC	1.000 (0.762 – 1.188)	2.8 (0.36 – 3.81)	3.3 (1.12 – 5.96)
KB	1.300 (0.859 – 2.451)	1.7 (0.89 – 4.99)	3.3 (1.75 – 7.22)
Zn mg/kg	$p_1=0.144$ $p_2=0.309$	$p_1=0.008$ $p_2=0.030^d$	$p_1=0.916$ $p_2=0.982$
Kontrolle	0.900 (0.777–1.028)	164.6 (72.84 – 264.67)	144.6 (79.92 – 215.25)
IBD	0.900 (0.681 – 1.505)	96.9 (5.00 – 200.48)	136.4 (48.99 – 282.15)
UK	0.900 (0.748 – 0.908)	112.4 (5.00 – 150.53)	124.6 (75.86 – 281.23)
KB	0.900 (0.681 – 1.505)	71.2 (49.38 – 200)	148.2 (48.99 – 282.15)

Se mg/kg	$p_1=0.144$ $p_2=0.075$	nije detektovan	nije detektovan
Kontrole	0,070 (0.038 – 0,118)		
IBD	0,570 (0.024 – 0.111)		
UK	0,040 (0.024 – 0.109)		
KB	0.070 (0.032 – 0.111)		

Skraćenice: IBD- zapaljenske bolesti creva; KB- Kronova bolest; UK- Ulcerozni kolitis.

p_1 - IBD vs Kontrole (korišćen test Mann–Whitney U); p_2 – poređenje među podgrupama (UK vs KB, UK vs Kontrole, KB vs Kontrole) (korišćen test Kruskal Wallis H); značajne p vrednosti su podebljane; podaci su prikazani kao medijane (min - max).

^{a1}-UK vs Kontrole $p=1.000$, KB vs Kontrole $p=0.760$, **UK vs KB $p=0.010$** ; ^{a2} UK vs Kontrole $p=0.190$, **KB vs Kontrole $p=0.032$** , UK vs KB $p=1.000$; ^b UK vs Kontrole $p=0.772$, **KB vs Kontrole $p=0.001$** , UK vs KB $p=0.067$; ^c UK vs Kontrole $p=1.000$, KB vs Kontrole $p=0.119$, UK vs KB $p=0.056$; ^d UK vs Kontrole $p=0.079$, KB vs Kontrole $p=0.091$, UK vs KB $p=1.000$.

Poređenje oligoelemenata u tkivu između ispitivanih grupa prikazano je u tabelama 4.2.2, 4.2.3 i 4.2.4. Kada su u pitanju esencijalni makroelementi magnezijum je bio jedini koji je pokazao statistički značajne promene. Naime, ovaj metal bio je snižen u obolelih od IBD u odnosu na kontrolnu grupu u tri segmenta creva: terminalni ileum, cekum i sigmoidni kolon ($p=0.021$, $p=0.031$ i $p=0.040$). Terminalni ileum se pokazao kao značajan segment creva za dijagnostiku sa većim brojem razlika u koncentracijama metala među poređenim grupama. Upravo u ovom segmentu bakar, mangan i cink bili su statistički značajno sniženi u IBD grupi ($p=0.017$, $p=0.007$, $p=0.008$). Kada se tri grupe (KB, UK i kontrolna) posmatraju odvojeno mangan i cink (ukupno $p=0.024$, $p=0.03$) zadržavaju, dok bakar ostaje u blizini statističke značajnosti ($p=0.055$). Nadalje, Mn je kod dece obolele od KB bio snižen u odnosu na kontrole ($p=0.032$). S druge strane, cink je bio snižen i u UK i u KB podgrupi ($p=0.079$, $p=0.091$). Osim u terminalnom ileumu, bakar je bio statistički značajno snižen i u susednom cekumu IBD pacijenata u odnosu na kontrole ($p=0.046$).

Ispitivanje tkiva kolona obavljeno je analizom tkiva dobijenih sa njegovih 6 različitih segmenata. U cilju dobijanja jedinstvene vrednosti nekog metala za tkivo kolona koja bi se dalje mogla porediti među ispitivanim grupama izračunate su medijane za ovih 6 segmenata za svaki metal. Prikazani su rezultati za tkivo kolona u celini reprezentovani medijanama (u tabelama označeno kao kolon) (tabele 4.2.2 4.2.3) i odvojeno za svaki od šest pomenutih segmenata (tabela 4.2.4). Koncentracija većine toksičnih elemenata (aluminijuma, arsena i kadmijuma) bila je snižena u IBD i UK grupi u poređenju sa kontrolama (IBD $p=0.013$ $p=0.016$ $p=0.031$; UK $p=0.044$, $p=0.017$, $p=0.040$). Poređenje koncentracija ovih elemenata u kolonu segment po segment dalo je slične rezultate. Rezultati za arsen su bili najubedljiviji, s obzirom da su se za ovaj toksični metal razlikovali među podgrupama (KB, UK i kontrole) u četiri različita segmenta debelog creva (cekum, ascendentni, sigmoidni kolon i rektum) (ukupno $p=0.009$; $p=0.035$; $p=0.041$; $p=0.039$) sa najnižim vrednostima kod obolelih od UK (UK vs kontrole - ascendentni kolon $p=0.01$, sigmoidni kolon $p=0.035$, rektum $p=0.099$). U ovom slučaju KB je bila različita u odnosu na UK, te su kod bolesnika sa KB vrednosti As bile slične kao u kontrolnoj grupi, a nekada čak i veće. S obzirom na ovu činjenicu, ne možemo biti iznenađeni što su u poređenju IBD grupe sa kontrolom statistički značajne razlike izgubljene u nekim segmentima (As je bio snižen u ascendentnom i sigmoidnom kolonu $p=0.035$, $p=0.049$). U descendentnom kolonu aluminijum je bio snižen u UK grupi ($p=0.042$), a osim u ovom segmentu i u cekumu i ascendentnom kolonu u IBD grupi u odnosu na kontrolnu. Nadalje, kadmijum je pokazao statistički značajno sniženje u IBD grupi u cekumu i descendentnom kolonu ($p=0.04$, $p=0.023$).

Tabela 4.2.3. Koncentracija toksičnih metala u serumu u trenutku postavljanja dijagnoze u serumu, tkivu terminalnog ileuma i kolona kod dece obale od IBD, KB i UK

Varijabla	Serum	Ileum	Kolona
As µg/kg	nije detektovan	$p_1=0.947$ $p_2=0.660$	$p_1=0.016$ $p_2=0.017^a$
Kontrole		1.9 (<0.1 – 9.6)	3.1 (1.5 – 5.0)
IBD		2.2 (<0.1 - 5.1)	1.0 (<0.1 – 11.4)
UK		2.3 (<0.1– 3.6)	0.6 (<0.1– 3.3)
KB		2.1 (1.2 – 5.1)	2.2 (<0.1– 11.4)
Cd µg/kg	$p_1=0.867$ $p_2=0.771$	$p_1=0.053$ $p_2=0.206$	$p_1=0.031$ $p_2=0.046^b$
Kontrole	4.0 (3.1 – 4.7)	167.9 (38.2 – 415.4)	80.4 (64.4 – 458.4)
IBD	4.0 (3.0 - 21)	198.5 (29.0 – 684.2)	64.9 (25.7 – 238.2)
UK	3.7 (3.0 – 21.0)	94.8 (29.0 – 215.7)	55.2 (25.7 – 152.8)
KB	4.0 (3.8 – 4.6)	273.9 (39.7 – 684.2)	69.8 (26.9 – 238.2)
Al mg/kg	nije detektovan	$p_1=0.254$ $p_2=0.175$	$p_1=0.013$ $p_2=0.036^c$
Kontrole		9.0 (2.0 – 51.8)	10.5 (4.1 – 44.1)
IBD		4.0 (1.0 – 198.0)	4.7 (2.41 – 19.75)
UK		2.3 (1.0 – 18.7)	3.6 (2.7 – 14.7)
KB		5.6 (3.4 – 198.0)	6.7 (2.4 – 19.8)
Cr mg/kg	nije detektovan	$p_1=0.448$ $p_2=0.728$	$p_1=0.616$ $p_2=0.210$
Kontrole		0.7 (0.02 – 2.2)	0.1 (0.06 – 0.2)
UK		0.2 (0.01 – 1.8)	0.1 (0.06 – 0.6)
KB		0.2 (<0.01 – 0.4)	0.2 (0.02 – 0.5)

Skraćenice: IBD- Inflammatory bowel disease; CD- Crohn's disease; UC- Ulcerative colitis.

p_1 - IBD vs Kontrole (korišćen test *Mann-Whitney U*); p_2 – UK vs KB vs Kontrole (korišćen test *Kruskal Wallis H*); značajne p vrednosti su podebljane; podaci su prikazani kao medijane (min - max).

^a **UK vs Kontrole $p=0.013$** , KB vs Kontrole $p=0.552$, UC vs CD $p=0.359$; ^b **UK vs Kontrole $p=0.04$** , KB vs Kontrole $p=0.572$, UK vs KB $p=0.664$; ^c **UK vs Kontrole $p=0.044$** , KB vs Kontrole $p=0.203$, UK vs KB $p=1.000$.

I četvrti ispitivani toksični metal pokazao je interesantne razlike u tkivu kolona. Naime, kada je reč o hromu, njegova koncentracija je, za razliku od ostalih toksičnih metala, bila viša u grupama pacijenata (IBD i KB) u odnosu na kontrole u transverzalnemu delu kolona (IBD vs Kontrole $p=0.022$, KB vs Kontrole $p=0.031$).

Tabela 4.2.4. Koncentracija esencijalnih oligoelemenata u trenutku postavljanja dijagnoze u šest različitih segmenata kolona kod dece obolele od IBD, KB i UK i kontrola

Variable	cekum	ascendentni kolon	transverzalni kolon	descendentni kolon	sigmoidni kolon	rektum
Na mg/kg	<i>p</i> 1=0.824 <i>p</i> 2=0.889	<i>p</i> 1=0.222 <i>p</i> 2=0.324	<i>p</i> 1=0.114 <i>p</i> 2=0.285	<i>p</i> 1=0.317 <i>p</i> 2=0.563	<i>p</i> 1=0.317 <i>p</i> 2=0.424	<i>p</i> 1=0.405 <i>p</i> 2=0.647
Kontrole	3091.9 (510.4 – 5000.7)	2604.5 (217.7-5937.7)	2238.9 (1614.5-4154.2)	2400.2 (1909.8- 3127.1)	3101.9 (1032.9-6388.3)	2357.0 (1434.8-4830.5)
IBD	2878.1 (505.9 – 4771.4)	3271.0 (827.9 – 6017.9)	3147.3 (896.7 – 4562.5)	2691.5 (884.7 – 7786.6)	2171.1 (1859.5 –4492.3)	3113.6 (444.9 – 6696.6)
UK	2878.1 (1309.8-4771.4)	3546.6 (1540.2-6017.9)	3136.5 (1668.1-4562.5)	2760.6 (884.7 – 6405.5)	2209.8 (1896.4-4492.3)	3113.6 (1363.2- 6696.6)
KB	2963.1 (505-4118.5)	2904.9 (827-4656.0)	3158.2 (896.7- 4064.4)	2622.5 (1293.4 -7786.6)	2128.7 (1859.5- 4411.0)	3071.5 (444.9- 5556.2)
Mg mg/kg	<i>p</i>1=0.031 <i>p</i> 2=0.094	<i>p</i> 1=0.868 <i>p</i> 2=0.967	<i>p</i> 1=0.598 <i>p</i> 2=0.665	<i>p</i> 1=0.126 <i>p</i> 2=0.218	<i>p</i>1=0.040 <i>p</i> 2=0.110	<i>p</i> 1=0.657 <i>p</i> 2=0.835
Kontrole	536.7 (207.8- 1921.8)	298.4 (47.2 – 971.3)	384.2 (70.2-1298.5)	427.1 (133.5- 1038.0)	613.1 (127.9-1497.1)	418.8 (75-1763.1)
IBD	200.2 (15.3 – 1309.3)	422.0 (16.0 – 1163.5)	221.8 (14.8 – 1648.2)	272.0 (17.5 – 1470.5)	310.4 (9.5 – 782.9)	436.6 (18.0 – 1133.1)
UK	200.2 (158.4- 546.4)	331.8 (199.6 – 918.7)	187.7 (14.8-682.6)	276.3 (105.6- 659.3)	318.9 (220.1 – 761.1)	462.1 (213.4- 1039.7)
KB	286.0 (15.3-1309.3)	440.8 (16.0-1163.5)	468.8 (15.1- 1648.2)	267.7 (17.5- 1470.5)	297.0 (9.5-782.9)	405.6 (18.0- 1133.1)
K mg/kg	<i>p</i> 1=0.471 <i>p</i> 2=0.740	<i>p</i> 1=0.471 <i>p</i> 2=0.771	<i>p</i> 1=0.792 <i>p</i> 2=0.732	<i>p</i> 1=0.833 <i>p</i> 2=0.967	<i>p</i> 1=0.562 <i>p</i> 2=0.542	<i>p</i> 1=0.375 <i>p</i> 2=0.171
Kontrole	4602.3 (1371.8 – 8793.7)	4583.9 (152.9 – 11433.6)	4076.1 (572.2 – 10254.0)	5279.5 (1384.8 – 6373.1)	5803.5 (1115.6 – 9023.3)	4244.7 (404.3 – 7941.3)
IBD	2973.2 (118.1 –11383.6)	5926.7 (207.4 -11686.4)	3153.1 (149.4 -11220.8)	3523.1 (111.0 – 13955.8)	4585.8 (114.8 – 9967.4)	5706.8 (183.3 – 17272.1)
UK	2973.2 (2121.9–9599.7)	5090.6 (3214.5-10722.3)	3139.4 (162.3- 9645.0)	5130.3 (949.3 – 9670.8)	4964.2 (1768.8–9967.4)	6630.5 (3343.9-11519.4)
KB	4320.9 (118.1–11383.6)	6317.0 (207.4–11686.4)	3807.6 (149.4–11220.8)	2997.2 (111.0–13955.8)	4313.9 (114.8 – 9510.3)	4505.350 (183 – 17272.1)

Ca mg/kg	$p1=0.222$ $p2=0.401$	$p1=0.244$ $p2=0.468$	$p1=0.635$ $p2=0.836$	$p1=0.673$ $p2=0.913$	$p1=0.527$ $p2=0.511$	$p1=0.375$ $p2=0.655$
Kontrolle	345.3 (179.1 – 1015.2)	434.5 (53.8 – 1219.5)	236.0 (91.8 – 1359.0)	326.5 (121.3 – 843.0)	337.2 (171.3 – 1672.2)	566.0 (39.0 – 1107.7)
IBD	335.9 (44.0 – 1015.0)	336.2 (13.4 – 2591.9)	182.0 (14.4 – 2041.2)	221.9 (32.5 – 1893.3)	357.9 (15.5 – 1426.7)	367.2 (32.5 – 1221.4)
UK	335.9 (120 – 583.3)	242.2 (139.6 – 1014.7)	139.2 (14.4 – 2041.2)	229.8 (99.9 – 530.8)	337.9 (190.6 – 1426.7)	367.2 (134.6 – 1161.8)
KB	237.7 (44.0 – 1015.0)	366.8 (13.4 – 2591.9)	224.8 (32.4 – 1908.8)	214.1 (32.5 – 1893.3)	378.0 (15.5 – 822.1)	422.3 (32.5 – 1221.4)
Cr mg/kg	$p1=0.616$ $p2=0.139$	$p1=0.345$ $p2=0.580$	$p1=0.022$ $p2=0.037^a$	$p1=0.291$ $p2=0.533$	$p1=0.476$ $p2=0.307$	$p1=0.868$ $p2=0.726$
Kontrolle	0.70 (0.02 – 14.21)	0.16 (0.03 – 3.63)	0.07 (<0.01 – 0.17)	0.10 (<0.01 – 0.22)	0.16 (0.02 – 0.56)	0.09 (0.05 – 0.18)
IBD	0.06 (0.04 – 1.22)	0.12 (0.01 – 0.47)	0.14 (<0.01– 0.58)	0.16 (<0.01– 10.11)	0.70 (0.02 – 3.59)	0.11 (0.02 – 1.11)
UK	0.06 (0.04 – 0.09)	0.11 (0.01 – 0.47)	0.10 (<0.01– 0.45)	0.13 (0.04 – 10.11)	0.06 (0.02 – 3.59)	0.09 (0.04 – 0.59)
KB	0.14 (0.06 – 1.22)	0.12 (0.01 – 0.45)	0.18 (0.02 – 0.58)	0.20 (<0.01– 0.60)	0.11 (0.05 – 1.06)	0.13 (0.02 – 1.11)
Mn mg/kg	$p1=0.471$ $p2=0.724$	$p1=0.824$ $p2=0.731$	$p1=0.384$ $p2=0.658$	$p1=0.114$ $p2=0.274$	$p1=0.140$ $p2=0.132$	$p1=0.233$ $p2=0.442$
Kontrolle	1.18 (0.37 – 4.64)	0.94 (0.50 – 10.49)	1.12 (0.37 – 3.37)	1.54 (0.64 – 2.58)	1.45 (0.67 -5.79)	1.76 (0.27 – 3.93)
IBD	0.81 (0.18 – 5.13)	1.10 (0.11 – 4.53)	0.75 (0.16 – 6.67)	0.66 (0.13 – 8.97)	1.13 (0.11 – 3.86)	0.87 (0.10 – 4.20)
UK	0.81 (0.64 – 2.07)	1.12 (0.78 – 2.40)	0.75 (0.16 – 3.45)	0.87 (0.27 – 5.69)	1.06 (0.72 – 3.86)	0.87 (0.50 – 4.20)
KB	0.85 (0.18 – 5.13)	1.02 (0.11 – 4.53)	0.75 (0.21 - 6.67)	0.63 (0.13 – 8.97)	1.2 (0.11 – 2.01)	1.05 (0.10 – 1.97)
Fe mg/kg	$p1=0.868$ $p2=0.549$	$p1=0.222$ $p2=0.332$	$p1=0.562$ $p2=0.315$	$p1=0.527$ $p2=0.762$	$p1=0.317$ $p2=0.595$	$p1=0.346$ $p2=0.617$
Kontrolle	25.07 (7.04 – 134.04)	26.29 (18.33 – 740.60)	26.71 (9.18 – 63.57)	30.97 (13.59 – 310.47)	56.18 (9.51 – 197.29)	27.84 (19.10 – 101.29)
IBD	28.05 (5.83 – 151.20)	43.71 (10.61 – 102.82)	30.81 (6.05 – 60.69)	32.21 (14.02 – 633.30)	33.37 (5.46 – 379.79)	40.82 (5.05 – 120.39)
UK	23.03 (5.83 – 107.83)	30.23 (22.16 – 59.38)	25.35 (6.05 – 50.36)	25.76 (14.02 – 633.30)	31.45 (16.47 – 88.94)	34.95 (8.67 – 86.97)
KB	44.70 (9.19 – 151.20)	48.64 (10.61 – 102.82)	34.37 (17.95 – 60.69)	36.12 (19.84 – 180.08)	35.30 (5.46 - 379.79)	49.73 (5.05 – 120.39)

Cu mg/kg	p1=0.046 p2=0.094	p1= 0.255 p2=0.480	p1= 0.343 p2=0.543	p1= 0.097 p2=0.246	p1= 0.092 p2=0.240	p1= 0.618 p2=0.845
Kontrolle	4.40 (2.98 – 8.20)	3.76 (0.98 – 24.22)	4.30 (1.76 – 10.39)	5.72 (1.96 – 7.44)	5.76 (1.90 – 10.44)	4.39 (1.63 – 8.56)
IBD	2.11 (1.06 – 9.68)	2.91 (1.02 – 9.53)	3.79 (0.83 – 9.54)	2.86 (0.69 – 12.17)	2.96 (0.66 – 12.14)	4.05 (0.51 – 11.68)
UK	1.99 (1.06 – 5.00)	2.64 (1.02 – 7.55)	3.01 (0.83 – 7.28)	2.45 (0.69 – 12.17)	3.52 (1.55 – 9.07)	4.18 (2.05 – 11.68)
KB	2.15 (1.35 – 9.68)	3.53 (1.62 – 9.53)	4.58 (1.58 – 9.54)	3.17 (1.03 – 10.20)	2.41 (0.66 – 12.14)	3.56 (0.51 – 8.54)
Zn mg/kg	p1= 0.166 p2=0.294	p1= 0.824 p2=0.924	p1= 0.712 p2=0.557	p1= 0.292 p2=0.564	p1= 0.833 p2=0.828	p1= 0.868 p2=0.715
Kontrolle	171.7 (109.06–239.48)	171.2 (65.22 – 595.63)	139.5 (61.97 – 389.57)	164.5 (67.93 – 191.02)	128.8 (39.33 – 340.39)	141.8 (51.62 – 346.21)
IBD	91.1 (45.40 – 316.94)	159.0 (34.05 – 418.00)	124.1 (32.67- 324.69)	114.4 (35.49 – 437.40)	125.1 (34.08 – 344.40)	161.0 (14.89 – 793.59)
UK	85.0 (53.24 – 233.93)	167.6 (83.44 – 372.92)	94.1 (32.67 – 281.23)	104.1 (49.86 – 261.20)	126.6 (64.92 – 344.40)	165.7 (83.70 – 793.59)
KB	105.1 (45.40 – 316.94)	159.0 (34.05 – 418.00)	186.6 (37.79 – 324.69)	122.1 (35.49 – 437.40)	123.6 (34 – 258.01)	145.4 (14.89– 506. 76)
As µg/kg	p1= 0.053 p2=0.009^b	p1=0.035 p2=0.035^c	p1= 0.912 p2=0.757	p1= 0.183 p2=0.412	p1=0.049 p2=0.041^d	p1= 0.324 p2=0.039^e
Kontrolle	2.05 (<0.1 – 8.2)	4.05 (1.3 – 74.1)	1.30 (<0.1 – 6.3)	2.70 (1.9 – 11.0)	3.15 (<0.1 – 10.6)	3.75 (<0.1 – 10.2)
IBD	0.20 (<0.1– 6.7)	1.30 (<0.1– 13.1)	0.55 (<0.1– 14.8)	1.35 (<0.1– 313)	0.60 (<0.1– 7.7)	2.00 (<0.1– 8.0)
UK	<0.10 (<0.1-1.2)	1.150 (<0.1– 3.1)	<0.10 (<0.1– 3.3)	1.20 (<0.1– 313.0)	<0.10 (<0.1– 3.7)	<0.10 (<0.1– 2.9)
KB	1.70 (<0.1– 6.7)	3.00 (<0.1-13.1)	1.80 (<0.1– 14.8)	1.50 (<0.1– 18.3)	2.60 (<0.1– 7.7)	4.45 (<0.1– 8.0)
Cd µg/kg	p1=0.040 p2=0.087	p1=0.437 p2=0.683	p1=0.147 p2=0.324	p1=0.023 p2=0.051	p1=0.370 p2=0.190	p1=0.437 p2=0.472
Kontrolle	192.3 (64.6 – 1540.0)	88.9 (17.3 -3731.9)	99.9 (19.3 – 5126.5)	113.1 (19.3 – 622.2)	90.5 (11.9 – 447.6)	65.3 (10.8 – 536.5)
IBD	48.0 (17.6 – 3363.9)	118.8 (1.6 – 1246.0)	76.5 (7.4 – 420.4)	38.4 (6.6 – 823.9)	58.1 (3.5 – 1499.2)	92.5 (3.5 – 1394.8)
UK	48.0 (17.6.287.1)	214.5 (1.6 – 355.6)	67.0 (17.0 – 147.5)	26.6 (6.6 – 144.0)	33.4 (3.5 – 85.9)	107.4 (35.6 – 1394.8)
KB	134.6 (26.4 – 3363.9)	75.4 (27.3 – 1246.0)	86.1 (7.4 – 420.4)	46.1 (9.7 – 823.9)	98.1 (11.8 – 1499.2)	75.5 (3.5 – 318.9)

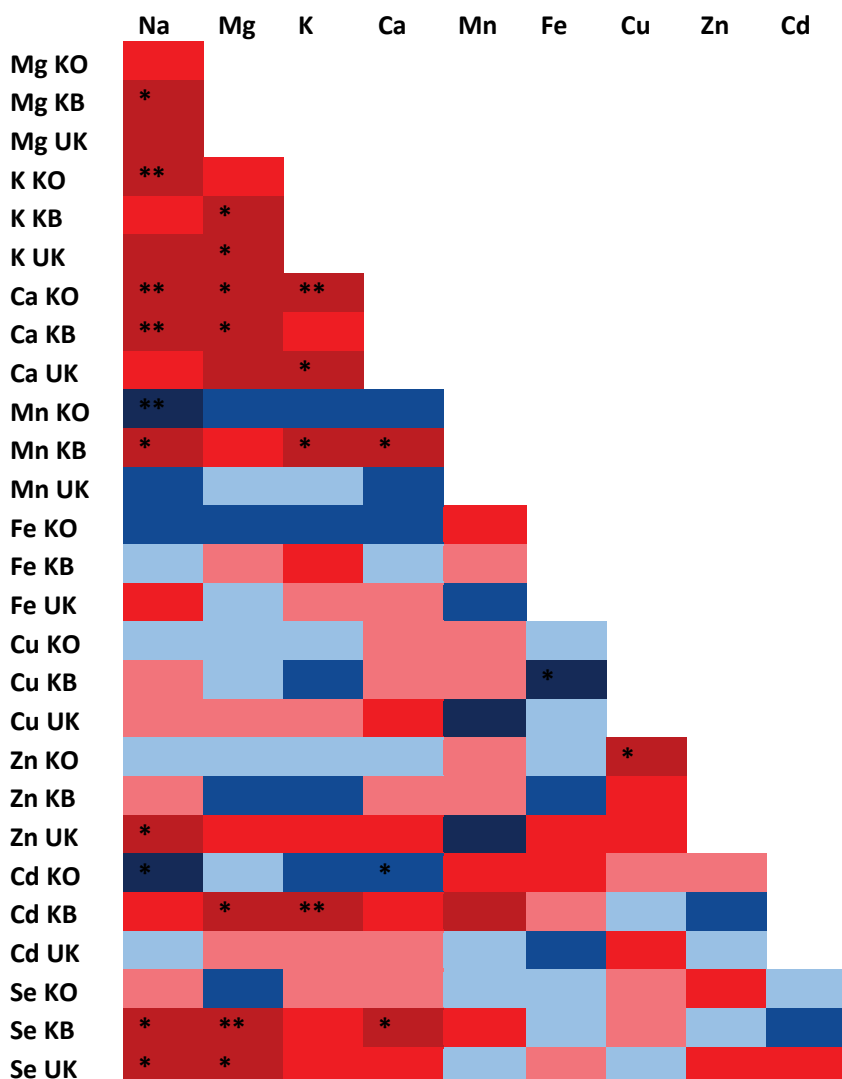
Al mg/kg	p1=0.008 p2=0.029^f	p1=0.046 p2=0.126	p1=0.155 p2=0.308	p1=0.010 p2=0.030^e	p1=0.126 p2=0.168	p1=0.318 p2=0.597
Kontrole	9.7 (2.97 – 44.33)	21.9 (3.74 – 217.17)	12.0 (2.12 – 19.01)	8.4 (3.51 – 40.82)	7.8 (1.13 – 294.63)	6.7 (4.01 – 182.40)
IBD	4.0 (0.90 – 19.26)	5.6 (0.85 – 32.44)	4.0 (1.32 – 297.04)	3.0 (1.37 – 27.06)	3.2 (1.04 – 102.82)	5.34 (0.34 – 56.44)
UK	4.0 (0.90 – 13.43)	7.6 (2.29 – 32.44)	3.6 (1.32 – 40.26)	2.9 (1.63 – 11.46)	2.9 (1.81 – 10.47)	4.6 (3.06 – 56.44)
KB	3.4 (2.09 – 19.26)	5.6 (0.85 – 25.41)	4.4 (1.40 – 297.04)	3.0 (1.37 – 27.06)	6.2 (1.04 – 102.82)	6.3 (0.34 – 16.89)

Skraćenice: IBD - Inflammatory bowel disease - zapaljenske bolesti creva; KB - Kronova bolest; UK – ulcerativni kolitis.

p1 - IBD vs Kontrole; p2 – UK vs KB vs Kontrole; significant p values are presented in boldface; ; značajne p vrednosti su podebljane; podaci su prikazani kao medijane (min - max).

^a- UK vs Kontrole p=0.676, **KB vs Kontrole p=0.031**, UK vs KB p=0.743; ^b**UK vs Kontrole p=0.010**, KB vs Kontrole p=1.000, , UK vs KB p=0.051; ^c**UK vs Kontrole p=0.029**, KB vs Kontrole p=0.700, UK vs KB p=0.406; ^d**UK vs Kontrole p=0.035**, KB vs Kontrole p=1.000, UC vs CD p=0.339; ^e UK vs Kontrole p=0.099, KB vs Kontrole p=1.000, UK vs KB p=0.057; ^f UK vs Kontrole p=0.095, KB vs Kontrole p=0.058 , UK vs KB p=1.000; ^g**UK vs Kontrole p=0.042**, KB vs Kontrole p=0.143 , UK vs KB p=1.000.

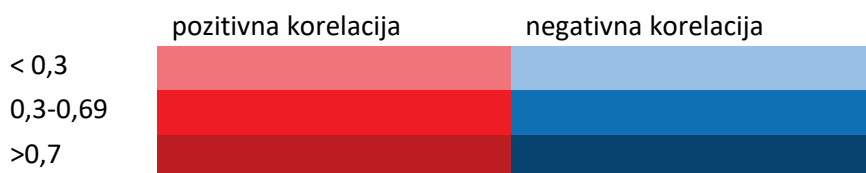
Spirmanov test je korišćen za određivanje korelacija koncentracija oligoelemenata u serumu kod pacijenata i kontrola. Rezultati su predstavljeni “heat“ mapom (slika 4.2.1).



KB- Kronova bolest, UK- ulcerozni kolitis, KO- Kontrole

* značajno

** visoko značajno



Slika 4.2.1. “Heat“ mapa Spirmanovih koeficijenata korelacije koncentracija oligoelemenata u serumu KB, UK pacijenata i kontrola.

Spirmanov test korišćen je i za određivanje korelacija između serumskih i tkivnih oligoelemenata i kliničkih podataka i laboratorijskih nalaza. Rezultati ovih korelacija predstavljeni su u tabeli 4.2.5.

Tabela 4.2.5. Korelacija koncentracija oligoelemenata u serumu i tkivu creva KB i UK pacijenata i njihovih kliničkih i laboratorijskih nalaza (prikazani su Spirmanovi koeficijenti korelacije rangova)

Ulcerozni kolitis				Kronova bolest			
Parametar	korelisao sa	<i>rs</i>	<i>p</i> -vrednost	Parametar	korelisao sa	<i>rs</i>	<i>p</i> -vrednost
Hemoglobin	Na-serum	0.86	0.014	Hemoglobin	NaTr	-0.67	0.050
	Zn-serum	0.79	0.036		MgAc	-0.67	0.050
	CdSg	-0.89	0.007		KDc	-0.67	0.050
			CrCk		0.73	0.039	
			FeDc		-0.78	0.013	
			CuDc		-0.80	0.010	
			ZnDc		-0.68	0.042	
			CdAc		-0.68	0.042	
			CdDc		-0.71	0.030	
			AlDc		-0.68	0.042	
CRP	Na-serum	0.96	0.001	CRP	NaAc	0.74	0.037
	Mg-serum	0.85	0.016		NaTr	0.76	0.028
	KS	0.81	0.027		NaDc	0.88	0.004
	Ca-serum	0.77	0.041		CrCk	-0.83	0.011
	FeAc	0.81	0.050		FeDc	0.76	0.028
	FeSg	0.77	0.410		CuDc	0.71	0.047
	Zn-serum	0.88	0.008				
Fekalni kalprotektin	FeAc	0.81	0.050	Fekalni kalprotektin	CrDc	0.68	0.045
	Cu-serum	0.82	0.023				
	AsAc	0.87	0.024				
Albumini	Zn-serum	0.79	0.039	Albumini	CrDc	-0.86	0.001
	AsTr	-0.80	0.032		Zn-serum	-0.76	0.027
	CdSg	-0.78	0.039				
	MnRt	-0.81	0.025				
PUCAI	NaCk	0.76	0.046	PCDAI	NaSg	0.76	0.027
	MnIl	-0.95	0.014		MnDc	-0.76	0.027
	CdAc	0.84	0.036		Mn-serum	-0.81	0.026
	AlAc	0.93	0.008		FeSg	0.76	0.027
	AlDc	-0.82	0.024		ZnIl	0.90	0.015
			Cd-serum		-0.81	0.026	
Mayo	CaCk	-0.866	0.012	SES-CD	NaSg	0.90	0.002
	CdCk	0.866	0.012		KSg	0.76	0.033
	NaTr	-0.797	0.032		Mn-serum	-0.80	0.032
	NaSg	-0.791	0.034		FeSg	0.75	0.033
	CrSg	-0.798	0.032				

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. CRP – C reaktivni protein; PUCAI - *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*; PCDAI - *Pediatric Crohn's Disease Activity Index*; SES-CD - *Simple Endoscopic Score* - jednostavan endoskopski skor; Il-ileum; Ck -cekum, Ac - ascendentni kolon; Tr - transversalni kolon; Dc – descendentni kolon; Sg - sigmoidni kolon; Rt – rectum.

Korelacije imunohistohemijskog parametra oksidativnog stresa 4-HNE sa koncentracijama oligoelemenata u tkivu prikazane su u tabeli 4.2.6.

Tabela 4.2.6. Korelacije imunohistohemijskog parametra oksidativnog stresa 4-HNE sa koncentracijama oligoelementima u tkivu

Kontrola	UK	KB
K-4-HNE zap.inf. <i>rs</i> =-0.707, <i>p</i> =0.033	K-4-HNE epitel <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012 K-imunoskor <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012	Na-imunoskor <i>rs</i> =-0.894, <i>p</i> =0.041
Ca-4-HNE zap.inf. <i>rs</i> =-0.707, <i>p</i> =0.033	Mg-4-HNE epitel <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012 Mg-imunoskor <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012	Cu-imunoskor <i>rs</i> =-0.894, <i>p</i> =0.041
Zn-4-HNE epitel <i>rs</i> =0.777, <i>p</i> =0.014 Zn-imunoskor <i>rs</i> =0.777, <i>p</i> =0.014	Fe-4-HNE epitel <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012 Fe-imunoskor <i>rs</i> =0.866, <i>p</i> =0.012	Cd-imunoskor <i>rs</i> =-0.894, <i>p</i> =0.041

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. Skraćenice: UK – ulcerozni kolitis, KB – Kronova bolest, imunoskop – imunohistohemijski skor, 4-HNE - 4 Hydroxynonenal; *rs* – Spirmanovi koeficijenti korelacije rangova

4.3. Morfometrijski, fraktalni i GLCM teksturalni parametri

U ovoj studiji bilo je uključeno 10 pacijenata obolelih od UK, 14 pacijenata obolelih od KB i 15 kontrola. Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata prikazane su uporedno u tabeli 4.3.1.

Tabela 4.3.1. Demografske i kliničke karakteristike dece obolele od UK, KB i kontrolne grupe dece

Varijabla	Kontrole	UK	KB	ukupni <i>p</i>
Pol				
Muški	60.0%	60.0%	78.6%	0.498 [£]
Ženski	40.0%	40.0%	21.4%	
Godine	11.3±5.1	14.4±3.3	12.1±4.8	0.271¥
PUCAI		32.5±19.0		
PCDAI			17.5±6.3	
<i>B. ileitis</i>				
da		33.3%		
ne		66.7%		

Skraćenice: KB- Kronova bolest; UK- Ulcerozni kolitis; PUCAI- Pedijatrijski indeks aktivnosti ulceroznog kolitisa; PCDAI- Pedijatrijski indeks aktivnosti Kronove bolesti; *B. ileitis*- backwash ileitis; ¥One way ANOVA (Post hoc Tukey Test); £Hi-kvadrat test.

Histološka aktivnost UK i KB je prikazana odgovarajućim regionalnim skorovima aktivnosti *Nancy* za UK (tabela 4.3.2, slika 4.3.1) i *GHAS* (tabela 4.3.3, slika 4.3.1) za KB.

Morfometrijskom analizom jedara pokazano je da sedam crevnih segmenata nisu potpuno morfometrijski uniformni kako kod zdravih tako i kod obolelih od KB i UK (tabele 4.3.4, 4.3.5, 4.3.6). Međutim, intersegmentne razlike u morfometrijskim karakteristikama jedara izgledale su drugačije u tri grupe ispitanika koje uključuje ova studija. Upadljiv je nalaz obolelih od KB kod kojih se po morfometrijskim karakteristikama uglavnom izdvajao rektum. Naime, kada su cirkularnost i koeficijent aspekta u pitanju postojala je razlika ovog segmenta u odnosu na transverzalni i descendenti kolon ($p<0.040$, $p<0.033$), dok se po površini jedra rektum razlikovao od ostatka kolona ($p<0.022$) (osim susednog sigmoidnog kolona). Zapravo, jedra rektuma su bila manja u odnosu na jedra ostatka kolona ne samo kod KB, već i kod UK ($p<0.018$) (kod UK statistički značajna razlika nije postojala jedino između rektuma i transverzalnog kolona). Veličina jedra i koeficijent aspekta kod pacijenata sa UK dijagnozom pokazali su se značajnim i za razlikovanje ileuma, dela creva koju ova bolest ne zahvata, od kolona koji je uvek u manjoj ili većoj meri zahvaćen bolešću ($p<0.007$, $p<0.025$).

Tabela 4.3.2. Regionalni *Nancy* skor za 6 različitih segmenata kolona

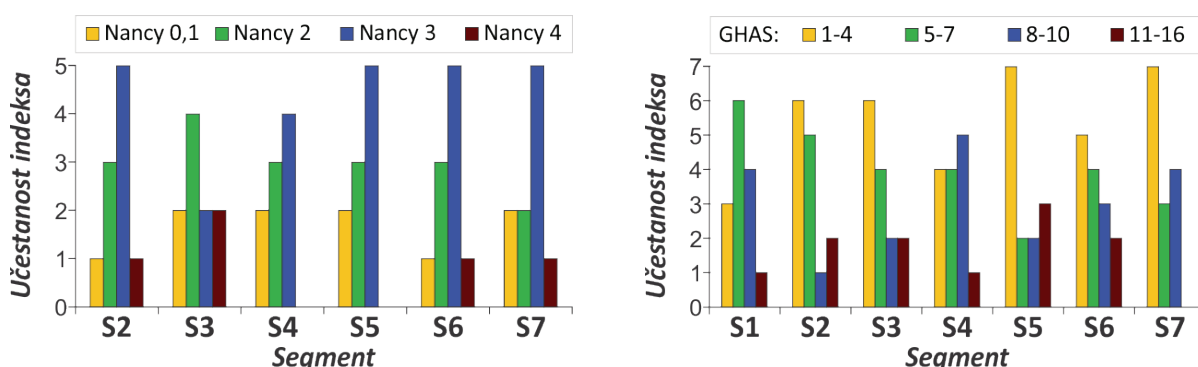
Segment	<i>Nancy</i> 0,1	<i>Nancy</i> 2	<i>Nancy</i> 3	<i>Nancy</i> 4
S2	1 (10.0 %)	3 (30.0 %)	5 (50.0 %)	1 (10.0 %)
S3	2 (20.0 %)	4 (40.0 %)	2 (20.0 %)	2 (20.0 %)
S4	2 (22.2 %)	3 (33.3 %)	4 (44.4 %)	
S5	2 (20.0 %)	3 (30.0 %)	5 (50.0 %)	
S6	1 (10.0 %)	3 (30.0 %)	5 (50.0 %)	1 (10.0 %)
S7	2 (20.0 %)	2 (20.0 %)	5 (50.0 %)	1 (10.0 %)

Skraćenice: S2–cecum; S3–ascendentni kolon; S4–transverzalni kolon; S5–descendentni kolon; S6–sigmoidni kolon; S7–rektum.

Tabela 4.3.3. Regionalni GHAS skor za 7 različitih segmenata kolona

Segment	GHAS 1,2,3,4	GHAS 5,6,7	GHAS 8,9,10	GHAS 11-16
S1	3 (21.43%)	6 (42.86%)	4 (28.57%)	1 (7.14%)
S2	6 (42.86%)	5 (35.71%)	1 (7.14%)	2 (14.29%)
S3	6 (42.86%)	4 (28.57%)	2 (14.29%)	2 (14.29%)
S4	4 (28.57%)	4 (28.57%)	5 (35.71%)	1 (7.14%)
S5	7 (50.00%)	2 (14.29%)	2 (14.29%)	3 (21.43%)
S6	5 (35.71%)	4 (28.57%)	3 (21.43%)	2 (14.29%)
S7	7 (50.00%)	3 (21.43%)	4 (28.57%)	

Skraćenice: GHAS - *Global Histology Activity Score* - Globalni skor histološke aktivnosti; S1–terminalni ileum; S2–cecum; S3–ascendentni kolon; S4–transverzalni kolon; S5–descendentni kolon; S6–sigmoidni kolon; S7–rektum.



Slika 4.3.1. Učestanost segmentnih *Nancy* (oboleli od UK) i GHAS indeksa (oboleli od KB).

Skraćenice: GHAS - *Global Histology Activity Score* - Globalni skor histološke aktivnosti.

Morfometrijske karakteristike jedara upoređene su među tri ispitivane grupe (kontrolna, UK i KB), a rezultati poređenja prikazani su odvojeno za svaki segment (slika 4.3.2). Za prikazivanje i dalju analizu izabrani su *Površina (Area)*, *Cirkularnost*, *Koeficijent aspekta (AR)* i *Solidnost (Solidity)*, kao najreprezentativniji parametri. Parametri elipse, koja najbolje opisuje oblik jedra (*best fit ellipse*), \bar{X}_c , Y_c i α , nisu dalje analizirani jer nisu informativni, već bi mogli poslužiti za dalje kompjuterske analize.

Jedra u terminalnom ileumu obolelih od KB i UK su se statistički značajno međusobno razlikovala prema svim analiziranim morfometrijskim karakteristikama ($p \leq 0.0056$). S izuzetkom površine jedra, statistički značajna razlika postojala je i između KB i kontrolne grupe ($p \leq 0.0062$) u svim ostalim analiziranim karakteristikama. Deca obolela od UK uglavnom su imala statistički značajno veća jedra u kolonu u odnosu na druge grupe (UK/KB $p \leq 0.0022$, UK/kontrole $p \leq 0.0029$), izuzeci su bili transverzalni kolon i rektum dok je descendentni kolon bio izuzetak samo u UK/KB poređenju. Stoga, veličina jedra se pokazala kao značajna za razlikovanje UK od KB i kontrolne grupe. S druge strane, jedra crevnih ćelija obolelih od KB generalno su imala manje kružni oblik u odnosu na kontrole i obolele od UK. Stoga, cirkularnost može poslužiti za razlikovanje KB prvenstveno od kontrolne grupe (bez statističke značajnosti za transverzalni i descendentni kolon), ali u

nekim segmentima razlika u cirkularnosti je bila dovoljna da izdvoji KB i od UK (statistički značajna razlika postoji u terminalnom ileumu, ascendentnom kolonu i rektumu) ($p=0.0019$, $p<0.0001$, $p<0.0001$). Koeficijent aspekta ćelijskog jedra, takođe je izdvajao obolele od KB od drugih grupa. No, njegove pretežno više vrednosti u ovoj grupi dale su statistički značajnu razliku u odnosu na obolele od UK i kontrole samo u terminalnom ileumu i rektumu ($p\leq 0.0003$, $p<0.0001$), dok je ascendentni kolon pokazao statistički značajnu razliku samo između KB i UK pacijenata ($p=0.0137$). Solidnost jedara bila je manja kod obolelih od KB, a ovaj parametar dobro je izdvajao KB od UK (terminalni ileum, ascendentni kolon, sigmoidni kolon i rektum) ($p\leq 0.0039$) i kontrola (terminalni ileum, cekum, rektum) ($p\leq 0.0062$).

Tabela 4.3.4. Morfometrijske karakteristike jedara dece u kontrolnoj grupi; podaci su prikazani kao mediane (min-max)

Morfom. karakt.	Intestinalni segmenti (S1–S7)							Statistički značajne razlike	
	ileum(S1)	cekum(S2)	k.asc.(S3)	k.tr.(S4)	k.dsc.(S5)	k.sig.(S6)	rektum(S7)	S2–S1	S2–S4
<i>Površina</i> (μm^2)	127.3 (32.8-289.9)	150.3 (56.9-333.5)	143.0 (41.3-372.9)	128.0 (34.5-323.3)	135.7 (33.1-314.2)	129.9±48.2 (49.87-346.7)	126.8 (45.5-310.6)	S2–S5	S2–S6
								S2–S7	($p<0.036$)
								S3–S1	S3–S4
								S3–S6	S3–S7
								(p<0.009)	
<i>Cirkular.</i>	0.862 (0.602-0.988)	0.848 (0.521-0.979)	0.840 (0.543-0.987)	0.846 (0.428-0.982)	0.832 (0.443-0.982)	0.828 (0.509-0.983)	0.850 (0.470-0.981)	S1–S5	S1–S6
								(p<0.001)	
								S7–S5	S7–S6
								(p<0.047)	
<i>Koef. aspekta</i>	1.588 (0.988-3.020)	1.685 (1.064-4.186)	1.737 (1.040-3.298)	1.662 (1.006-4.372)	1.684 (1.076-3.768)	1.721 (1.015-3.437)	1.629 (1.076-3.303)	S1–S2	S1–S3
								S1–S5	S1–S6
								(p<0.025)	
								S6–S7	(p<0.020)
<i>Solidnost</i>	0.990 (0.869-1.000)	0.990 (0.886-1.000)	0.987 (0.865-1.000)	0.989 (0.817-1.000)	0.986 (0.793-1.000)	0.988 (0.839-1.000)	0.990 (0.783-1.000)	S5–S1	S5–S2
								S5–S7 (p<0.018)	

S1 – terminalni ileum; S2 – cekum; S3 – ascendentni kolon; S4 – transversalni kolon; S5 – descendentni kolon; S6 – sigmoidni kolon; S7 – rektum; *Morfom. karakt.* – morfometrijska karakteristika; *Koef. aspekta* – koeficijent aspekta; *Cirkular.* – cirkularnost. Korišćen je *Kruskal Wallis* H test.

Tabela 4.3.5. Morfometrijske karakteristike jedara dece sa dijagnozom UK; podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

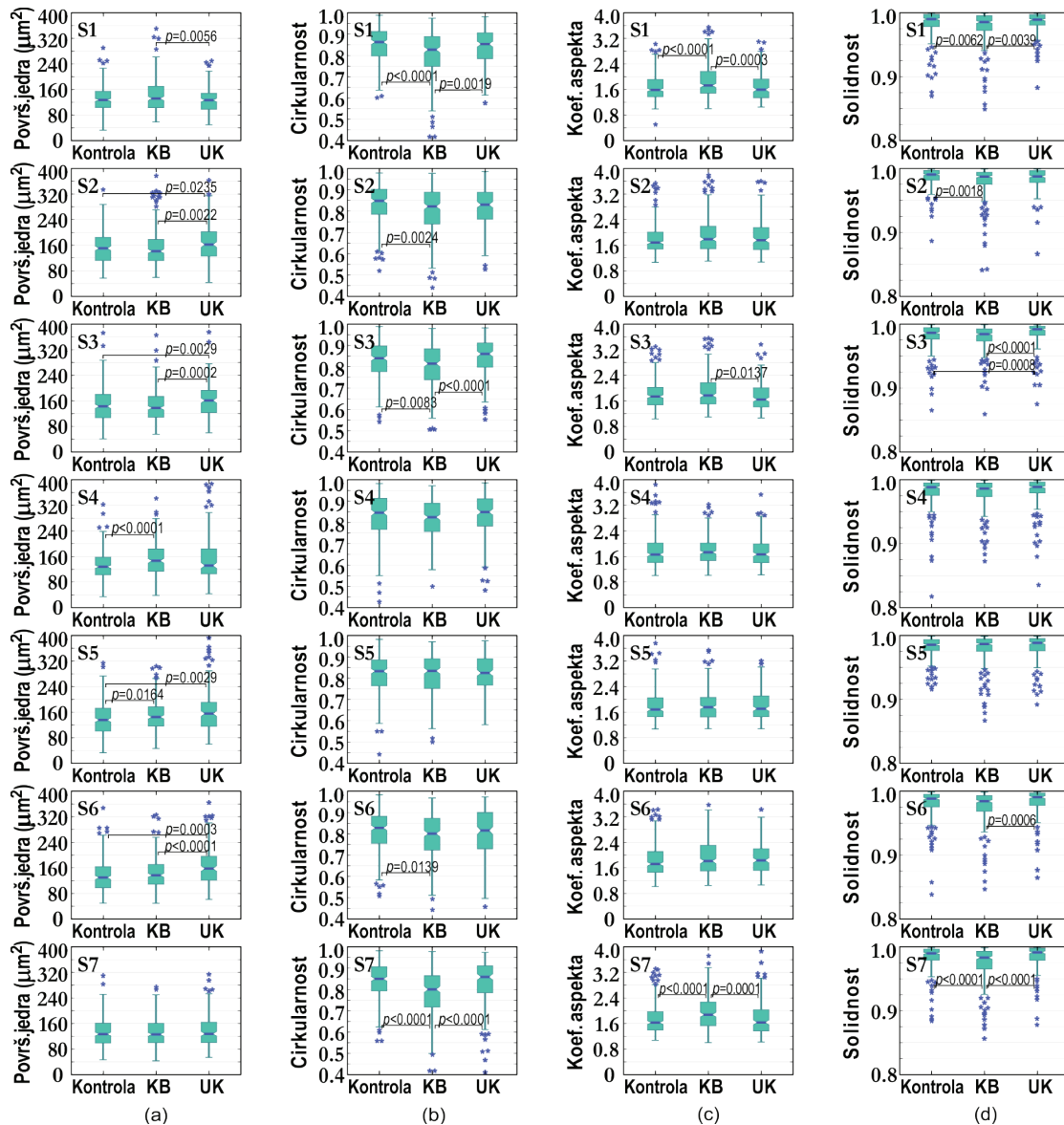
Morfom. Karakt.	Intestinalni segmenti (S1–S7)							Statistički značajne razlike	
	ileum(S1)	cekum(S2)	k.asc.(S3)	k.tr.(S4)	k.dsc.(S5)	k.sig.(S6)	rektum(S7)	S1–S2	S1–S3
<i>Površina</i> (μm^2)	126.6 (49.3-249.0)	162.0 (43.1-409.2)	161.1 (60.1-376.1)	131.9 (43.8-457.7)	155.9 (60.0-471.6)	157.9 (61.6-365.1)	127.7 (54.1-315.2)	S1–S4	S1–S5
								S1–S6	(p<0.007)
								S2–S4	S2–S7
								S3–S4	S3–S7
								S6–S4	S6–S7
								S5–S7 (p<0.018)	
<i>Cirkular.</i>	0.853 (0.578-0.981)	0.830 (0.526-0.986)	0.860 (0.552-0.982)	0.849 (0.481-0.98&)	0.824 (0.582-0.976)	0.816 (0.458-0.973)	0.858 (0.403-0.974)	S3–S6	(p<0.025)
<i>Koef. aspekta</i>	1.596 (1.053-3.096)	1.759 (1.075-3.607)	1.643 (1.064-3.368)	1.668 (1.027-4.082)	1.708(1.080- 3.203)	1.836 (1.063-4.617)	1.635 (1.024-4.898)	S1–S2	S1–S5
								S1–S6	S6–S3
								S6–S4	S6–S7
								(p<0.039)	
<i>Solidnost</i>	0.989 (0.882-1.000)	0.987 (0.867-1.000)	0.992 (0.874-1.000)	0.989 (0.836-1.000)	0.988 (0.892-1.000)	0.991 (0.864-1.000)	0.992 (0.878-1.000)	S3–S5	(p<0.048)

S1 – terminalni ileum; S2 – cekum; S3 – ascendentni kolon; S4 – transversalni kolon; S5 – descendentni kolon; S6 – sigmoidni kolon; S7 – rektum. *Morfom. karakt.* – morfometrijska karakteristika; *Koef. aspekta* – koeficijent aspekta; *Cirkular.* – cirkularnost. Korišćen je *Kruskal Wallis* H test.

Tabela 4.3.6. Morfometrijske karakteristike jedara dece sa dijagnozom KB; podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

Morfom. karakt.	Intestinalni segmenti (S1–S7)							Statistički značajne razlike	
	ileum(S1)	cecum(S2)	k.asc.(S3)	k.tr.(S4)	k.dsc.(S5)	k.sig.(S6)	rektum(S7)	S2–S7	S3–S7
Površina (μm ²)	131.8 (58.1-401.3)	141.2 (59.1-377.1)	138.0 (55.5-341.8)	146.8 (38.1- 341.8)	145.0 (46.7-305.1)	136.929 (49.408-326.1)	125.986 (43.1- 274.7)	S2–S7	S3–S7
Cirkular.	0.827 (0.419-0.975)	0.822 (0.440-0.977)	0.814 (0.504-0.979)	0.825 (0.498-0.972)	0.834 (0.501-0.970)	0.801 (0.286-0.968)	0.800 (0.418-0.978)	S4–S7	S5–S6
Koef. aspekta	1.726 (1.00- 4.621)	1.790 (1.106-5.329)	1.771 (1.096-3.564)	1.733 (1.013-4.286)	1.757 (1.082-3.531)	1.814 (1.050-8.226)	1.877 (1.005-5.456)	S4–S7	S5–S7
Solidnost	0.985 (0.849-1.000)	0.987 (0.841-1.000)	0.984 (0.859-1.000)	0.986 (0.872-1.000)	0.987 (0.797-1.000)	0.984 (0.875-1.000)	0.983 (0.856-1.000)	---	---

S1 – terminalni ileum; S2 – cecum; S3 – ascendentni kolon; S4 – transversalni kolon; S5 – descendentni kolon; S6 – sigmoidni kolon; S7 – rektum. *Morfom. karakt.* – morfometrijska karakteristika; *Koef. aspekta* – koeficijent aspekta; *Cirkular.* – cirkularnost. Korišćen je *Kruskal Wallis H* test.



Slika 4.3.2. Poređenje morfometrijskih karakteristika jedara dece obolele od UK, KB i kontrolne grupe dece. Korišćen je *Kruskal Wallis H* test. (Skraćenice: KB – Kronova bolest; UK- ulcerozni kolitis.)

Tabela 4.3.7. Korelacije morfolometrijskih parametara sa indeksima endoskopske i histološke aktivnosti i metalima u tkivu creva

Morfometrijski parametri – Korelacije			
Segment	Kontrola	UK	KB
S1	Zn-Cirk <i>rs</i> =0.648, <i>p</i> =0.043 Ca-Sol <i>rs</i> =-0.745, <i>p</i> =0.013		Area-Al <i>rs</i> =-0.857, <i>p</i> =0.014 Circ-Al <i>rs</i> =-0.857, <i>p</i> =0.014
S2	K-Area <i>rs</i> =-0.721, <i>p</i> =0.019 As-Circ <i>rs</i> =0.695, <i>p</i> =0.026 As-AR <i>rs</i> =-0.701, <i>p</i> =0.024	Cd-Cirk <i>rs</i> =-0.964, <i>p</i> <0.0001 Cd-AR <i>rs</i> =0.929, <i>p</i> =0.003 Cd-Sol <i>rs</i> =-0.929, <i>p</i> =0.003	Cr-Area <i>rs</i> =-0.732, <i>p</i> =0.039
S3	Ca-Area <i>rs</i> =0.648, <i>p</i> =0.043		Mg-Cirk <i>rs</i> =0.683, <i>p</i> =0.042 Mn-Area <i>rs</i> =0.667, <i>p</i> =0.050 Mn-Cirk <i>rs</i> =0.750, <i>p</i> =0.020 Cu-Area <i>rs</i> =0.667, <i>p</i> =0.050 Cu-Cirk <i>rs</i> =0.717, <i>p</i> =0.030 Zn-Cirk <i>rs</i> =0.750, <i>p</i> =0.020
S4	Cu-Cirk <i>rs</i> =-0.745, <i>p</i> =0.013	Na-Cirk <i>rs</i> =0.821, <i>p</i> =0.023, Cu-Sol <i>rs</i> =0.786, <i>p</i> =0.036	
S5	Na-Area <i>rs</i> =-0.709, <i>p</i> =0.022 Cr-Cirk <i>rs</i> =0.720, <i>p</i> =0.019 Cr-Sol <i>rs</i> =0.774, <i>p</i> =0.009		Ca-Sol <i>rs</i> =0.850, <i>p</i> =0.004 GHAS-Cirk <i>rs</i> =-0.738, <i>p</i> =0.003 AR-GHAS <i>rs</i> =0.705, <i>p</i> =0.005
S6	Mg-Cirk <i>rs</i> =-0.685, <i>p</i> =0.029 Mg-Sol <i>rs</i> =-0.648, <i>p</i> =0.043 Cu-Cirk <i>rs</i> =-0.648, <i>p</i> =0.043 Cu-Sol <i>rs</i> =-0.721, <i>p</i> =0.019		Na-Cirk <i>rs</i> =-0.783, <i>p</i> =0.013 GHAS-Cirk <i>rs</i> =-0.825, <i>p</i> <0.0001 GHAS-Sol <i>rs</i> =-0.592, <i>p</i> =0.026
S7	Mg-Sol <i>rs</i> =-0.709, <i>p</i> =0.022 Fe-Area <i>rs</i> =-0.745, <i>p</i> =0.013	Fe-AR <i>rs</i> =0.929, <i>p</i> =0.003 Mayo-AR <i>rs</i> =0.689, <i>p</i> =0.027	Cr-AR <i>rs</i> =-0.738, <i>p</i> =0.037 As-AR <i>rs</i> =-0.802, <i>p</i> =0.017 GHAS-Cirk <i>rs</i> =-0.633, <i>p</i> =0.015
Srednja vrednost morfolometrijskih parametara po pacijentu			SES-CD-cirk. <i>rs</i> =-0.599, <i>p</i> =0.024 SES-CD-Sol. <i>rs</i> =-0.594, <i>p</i> =0.025 GHAS (kOLON)-Cirk <i>rs</i> =-0.604, <i>p</i> =0.022 GHAS (ileum)-AR <i>rs</i> =0.568, <i>p</i> =0.034

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. Skraćenice: cirk - cirkularnost, Sol – solidnost, AR – koeficijent aspekta, GHAS - *Global Histological Activity Score* - globalni skor histološke aktivnosti; SES-CD - *Simple Endoscopic Score* - jednostavan endoskopski skor; *rs*- Spirmanov koeficijent korelacije rangova

Morfometrijski parametri korelirani su sa kliničkim, hematološkim i biohemijskim parametrima. Za ovu analizu korišćena je srednja vrednost (medijana) morfolometrijskog parametra za svakog pacijenta. Za ispitivanje korelacija korišćen je samo manji broj kliničkih, hematoloških i biohemijskih parametara, tj. korišćeni su oni parametri koji su se statistički značajno razlikovali među ispitivanim grupama (UK, KB i kontrole). U kontrolnoj grupi pokazana je negativna korelacija između HDL holesterola i površine jedra (*rs*=-0.600, *p*=0.023), a u grupi dece obolele od KB veća masa (percentili) i više eritrocita značilo je da će površina jedara crevnih ćelija biti veća (*rs*=0.610, *p*=0.027, *rs*=0.610, *p*=0.027), dok su

viši trombociti (veći MPV) značili okruglastija (veća cirkularnost) i solidnija jedra crevnih ćelija ($rs=0.623$, $p=0.017$, $rs=0.656$, $p=0.011$). Korelacija morfometrijskih parametara sa parametrom oksidativnog stresa 4-HNE donela je oskudne rezultate. Naime, korelisanost je uočena samo u kontrolnoj grupi. U pitanju je pozitivna korelacija između solidnosti jedra crevnih ćelija i ekspresije 4-HNE u zapaljenskom infiltratu ($rs=0.658$, $p=0.020$).

Korelacije morfometrijskih parametara sa metalima u tkivu creva prikazane su u tabeli 4.3.7.

U okviru ove teze analizirani su fraktalni parametri, odnosno fraktalna dimenzija (FD) i lakunarnost, ćelijskih jedara enterocita creva dece obolele od KB i UK i jedara dece u kontrolnoj grupi u cilju pronalaženja mogućih razlika u složenosti organizacije hromatina među pomenutim grupama. Kao i kod ispitivanja oligoelemenata u crevima i morfometrijskih karakteristika jedara creva i ovde je poređenje napravljeno između sedam različitih crevnih segmenata (terminalni ileum, cekum, ascendentni kolon, transverzalni kolon, descendentni kolon, sigmoidni kolon i rektum). Razlike u FD ispitivanih jedara između tri ispitivane grupe prikazane su na slici 4.3.3. i u tabeli 4.3.8. Poređenje između pomenutih sedam segmenata takođe je sprovedeno za svaku od tri grupe. Rezultati ovog poređenja prikazani su u tabeli 4.3.9. Deca obolela od UK su imala statistički značajno višu FD hromatina ćelijskih jedara debelog creva u odnosu na kontrole u svim segmentima osim rektuma ($p\leq 0.035$). Slično je bilo i u poređenju UK i KB grupa. Naime, ovoga puta deca obolela od UK su imala značajno više FD u poređenju sa decom obolelom od KB u čitavom kolonu osim njegovog transverzalnog dela ($p\leq 0.010$). Međutim, deca sa dijagnozom KB imala su statistički značajno različitu fraktalnu dimenziju jedara creva u odnosu na kontrole samo u rektumu ($p=0.014$). Srednje vrednosti FD obolelih od KB bile su niže u odnosu na kontrole. Treba istaći da je terminalni ileum dece obolele od KB, koji je jedna od najčešćih lokalizacija ove bolesti, imao statistički značajno izmenjenu FD samo u poređenju sa UK grupom. Međusegmentna poređenja kod KB pacijenata otkrivaju statistički značajno nižu nuklearnu FD u rektumu u poređenju sa ostalim segmentima (osim sigmoidnog kolona). Kod obolelih od UK ovaj parametar se pokazao korisnim za razlikovanje kolona (osim rektuma) i terminalnog dela ileuma, dela creva koji ova bolest ne zahvata ($p<0.002$). S druge strane, FD u crevnim segmentima u kontrolnoj grupi, bile su uniformnije.

Veličina i prostorna raspodela praznina u teksturi ćelijskih jedara, njihova prostorna raznolikost i nivo odstupanja slike od rotacione i translacione invarijancije određen je pomoću lakunarnosti tekture. Na osnovu ovog parametra dodatne statistički značajne razlike otkrivene su između KB i UK ($p\leq 0.001$), kao i UK i kontrola ($p\leq 0.002$). Rezultati su prikazani na slici 4.3.4. i u tabeli 4.3.10. Vrednosti lakunarnosti bile su najniže u UK grupi, a statistički značajne razlike bile su prisutne u većem delu kolona uz izuzetak upravo onih segmenata koji su predstavljali izuzetke i kod poređenja fraktalnih dimenzija jedara (transverzalni deo u KB-UK poređenju i rektum u poređenju između UK i kontrolne grupe). Kada je u pitanju terminalni deo tankog creva, lakunarnost njegovih jedara nije se statistički značajno razlikovala među poređenim grupama. Što se tiče poređenja lakunarnosti tekture jedara među segmentima, i ovde je uz par izuzetaka razlika primećena između istih segmenata kao u poređenju fraktalnih dimenzija. Rezultati su predstavljani u tabeli 4.3.11.

Tabela 4.3.8. Poređenje fraktalnih dimenzija između KB, UK i kontrolne grupe.

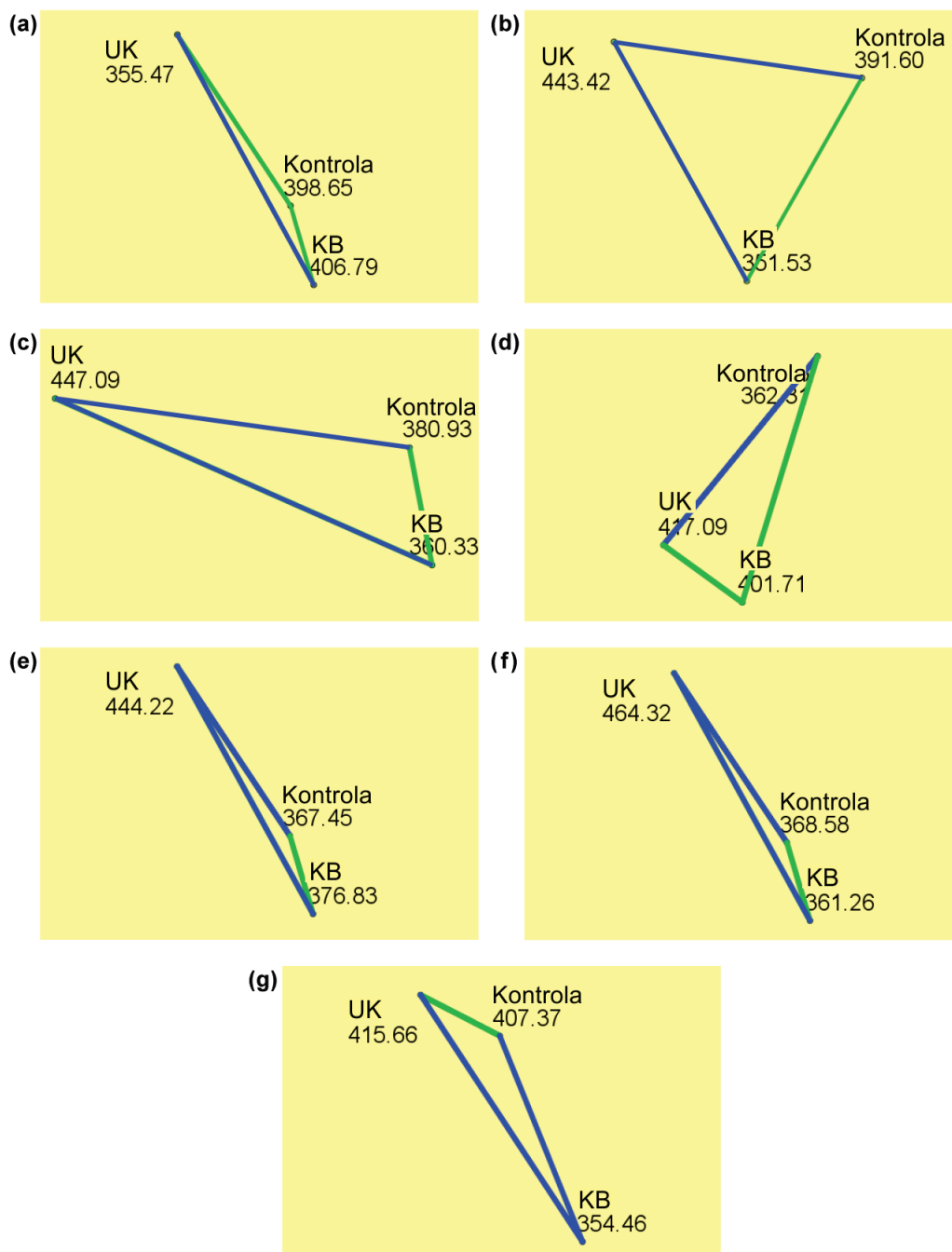
Intestinalni segment	Fraktalna dimenzija (FD)			Statistička značajnost (p vrednosti)
	Kontrolna grupa	Ulcerozni kolitis (UK)	Kronova bolest (KB)	
S1	1.728 (1.531-1.819)	1.722 (1.593-1.802)	1.728 (1.586-1.831)	KB-UK (0.042) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (0.107)
S2	1.741 (1.599-1.818)	1.755 (1.559-1.834)	1.732 (1.523-1.842)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (0.097) UK-Kontrola (0.035)
S3	1.736 (1.547-1.835)	1.752 (1.135-1.840)	1.732 (1.529-1.829)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (0.814) UK-Kontrola (0.004)
S4	1.728 (1.538-1.812)	1.738 (1.048-1.843)	1.736 (1.566-1.831)	KB-UK (1.000) KB-Kontrola (0.106) UK-Kontrola (0.023)
S5	1.734 (1.555-1.810)	1.747 (1.118-1.948)	1.734 (1.593-1.816)	KB-UK (0.004) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (0.001)
S6	1.727 (1.585-1.826)	1.749 (1.601-1.947)	1.722 (1.521-1.940)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (<0.0001)
S7	1.730 (1.536-1.818)	1.733 (1.511-1.824)	1.719 (1.524-1.944))	KB-UK (0.010) KB-Kontrola (0.014) UK-Kontrola (1.000)

Skraćenice: S1 – terminalni ileum, S2 – cekum, S3 – ascendentni kolon, S4 – transversalni kolon, S5 – descendentni kolon, S6 – sigmoidni kolon, S7 – rektum. Korišćen je *Kruskal Wallis* H test.

Tabela 4.3.9. Poređenje fraktalne dimenzije među crevnim segmentima

Intestinalni segment	Fraktalna dimenzija (FD)		
	Kontrolna grupa	Ulcerozni kolitis (UK)	Kronova bolest (KB)
S1	1.728 (1.531-1.819)	1.723 (1.593-1.802)	1.728 (1.586-1.832)
S2	1.741 (1.600-1.819)	1.755 (1.559-1.834)	1.732 (1.524-1.843)
S3	1.736 (1.547-1.835)	1.752 (1.135-1.840)	1.732 (1.529-1.829)
S4	1.728 (1.538-1.812)	1.738 (1.048-1.843)	1.736 (1.567-1.831)
S5	1.734 (1.555-1.811)	1.747 (1.118-1.948)	1.734 (1.593-1.816)
S6	1.727 (1.585-1.826)	1.749 (1.601-1.948)	1.722 (1.521-1.940)
S7	1.729 (1.536-1.818)	1.733 (1.511-1.824)	1.719 (1.524-1.944)
Stat.značajnost (p vrednosti)	S1-S2, S4-S2, S7-S2 ($p<0.090$)	S1-S4,S1-S6,S1-S5, S1-S3, S1-S2 ($p<0.002$) S7-S6, S7-S5, S7-S3, S7-S2 ($p<0.013$)	S7-S1, S7-S3, S7-S2, S7-S5, S7-S4 ($p<0.025$)

Skraćenice: S1 – terminalni ileum, S2 – cekum, S3 – ascendentni kolon, S4 – transverzalni kolon, S5 – descendentni kolon, S6 – sigmoidni kolon, S7 – rektum. Za sva poređenja korišćen je *Kruskal Wallis* H test.



Slika 4.3.3. Poređenje fraktalnih dimenzija (srednji rangovi) između KB, UK i kontrolne grupe za 7 različitih crevnih segmenata: a) terminalni ileum, b) cekum, c) ascendentni kolon, d) transverzalni kolon, e) descendentni kolon, f) sigmoidni kolon, g) rektum.

Skraćenice: UK – ulcerozni kolitis, KB – Kronova bolest

Tabela 4.3.10. Poređenje lakunarnosti između KB, UK i kontrolne grupe.

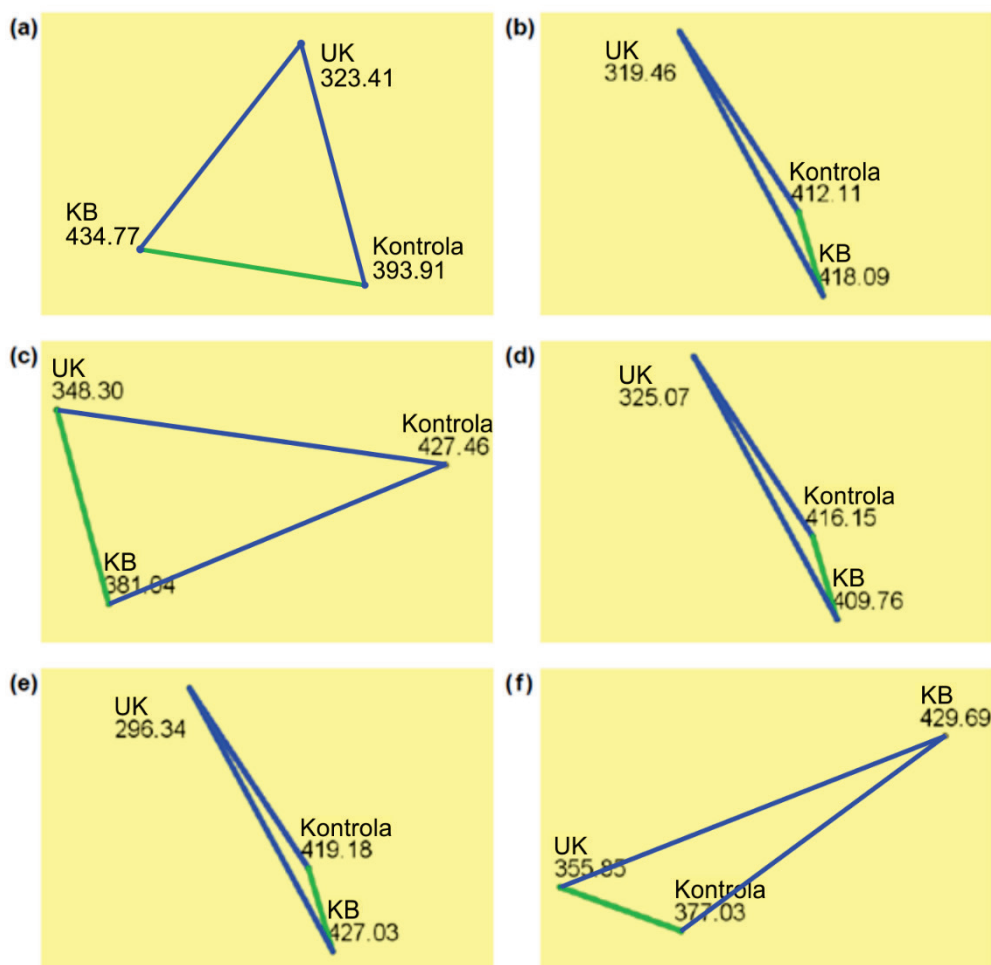
Intestinalni segment	Kontrolna grupa	Lakunarnost (Lac)		Statistička značajnost (p vrednosti)
		Ulcerozni kolitis (UK)	Kronova bolest (KB)	
S1	0.279 (0.197-0.517)	0.285 (0.209-0.455)	0.279 (0.172-0.430)	Sve grupe (0.074)
S2	0.266 (0.178-0.407)	0.253 (0.167-0.422)	0.282 (0.163-0.470)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (0.087) UK-Kontrola (0.002)
S3	0.274 (0.192-0.481)	0.260 (0.175-0.404)	0.279 (0.174-0.460)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (<0.0001)
S4	0.280 (0.198-0.482)	0.269 (0.181-0.554)	0.271 (0.184-0.442)	KB-UK (0.350) KB-Kontrola (0.039) UK-Kontrola (<0.0001)
S5	0.275 (0.191-0.475)	0.258 (0.037-0.365)	0.273 (0.273-0.430)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (<0.0001)
S6	0.280 (0.190-0.467)	0.257 (0.038-0.378)	0.287 (0.042-0.510)	KB-UK (<0.0001) KB-Kontrola (1.000) UK-Kontrola (<0.0001)
S7	0.276 (0.182-0.504)	0.272 (0.183-0.450)	0.289 (0.040-0.480)	KB-UK (0.001) KB-Kontrola (0.015) UK-Kontrola (0.909)

Skraćenice: S1 – terminalni ileum, S2 – cekum, S3 – ascendentni kolon, S4 – transverzalni kolon, S5 – descendentni kolon, S6 – sigmoidni kolon, S7 – rektum. Korišćen je *Kruskal Wallis* H test.

Tabela 4.3.11. Poređenje lakunarnosti među crevnim segmentima.

Intestinalni segment	Kontrolna grupa	Lakunarnost (Lac)	
		Ulcerozni kolitis (UK)	Kronova bolest (KB)
S1	1.728 (1.531-1.819)	1.723 (1.593-1.802)	1.728 (1.586-1.832)
S2	1.741 (1.600-1.819)	1.755 (1.559-1.834)	1.732 (1.524-1.843)
S3	1.736 (1.547-1.835)	1.752 (1.135-1.840)	1.732 (1.529-1.829)
S4	1.728 (1.538-1.812)	1.738 (1.048-1.843)	1.736 (1.567-1.831)
S5	1.734 (1.555-1.811)	1.747 (1.118-1.948)	1.734 (1.593-1.816)
S6	1.727 (1.585-1.826)	1.749 (1.601-1.948)	1.722 (1.521-1.940)
S7	1.729 (1.536-1.818)	1.733 (1.511-1.824)	1.719 (1.524-1.944)
Stat.značajnost (p vrednosti)	S1-S2, S4-S2, S7-S2 ($p<0.090$)	S1-S4, S1-S6,S1-S5, S1-S3, S1-S2 ($p<0.002$) S7-S6, S7-S5, S7-S3, S7-S2 ($p<0.013$)	S7-S1, S7-S3, S7-S2, S7-S5, S7-S4 ($p<0.025$)

Skraćenice: S1 – terminalni ileum, S2 – cekum, S3 – ascendentni kolon, S4 – transverzalni kolon, S5 – descendentni kolon, S6 – sigmoidni kolon, S7 – rektum. Za sva poređenja korišćen je *Kruskal Wallis* H test.



Slika 4.3.4. Poređenje lakunarnosti (srednji rangovi) između KB, UK i kontrolne grupe za 6 različitih crevnih segmenata: a) cecum, b) ascendentni kolon, c) transversalni kolon, d) descendentni kolon, e) sigmoidni kolon, f) rektum.

Skraćenice: UK – ulcerozni kolitis, KB – Kronova bolest

Korelacije fraktalne dimenzije i lakunarnosti sa metalima i indeksima endoskopske aktivnosti u tkivu prikazane su u tabeli 4.3.12. Pokazana je značajna korelacija između ukupnog *Nancy* indeksa (UK pacijenti) i srednje lakunarnosti (srednja lakunarnost izračunata za svakog pacijenta) ($r_s = -0.783$, $p = 0.007$) i GHAS indeksa u kolonu (KB pacijenti) i srednje lakunarnosti ($r_s = 0.550$, $p = 0.042$). Drugih značajnih korelacija između FD i lakunarnosti i histoloških indeksa (GHAS i *Nancy*, *Geboes*) nije bilo. Poređenje fraktalnih parametara (srednje vrednosti po pacijentu) sa laboratorijskim analizama pokazalo je pozitivnu korelaciju između broja eritrocita i FD kod obolelih od KB ($r_s = 0.556$, $p = 0.039$). Korelacija fraktalnih parametara sa imunohistohemijskim parametrom oksidativnog stresa dala je samo dve statistički značajne korelacije. U pitanju su pozitivna korelacija između 4-HNE u zapaljenjskom infiltratu i fraktalne dimenzije u kontrolnoj grupi ($r_s = 0.580$, $p = 0.048$) i negativna korelacija ekspresije 4-HNE u epitelu i srednje lakunarnosti ($r_s = -0.730$, $p = 0.025$).

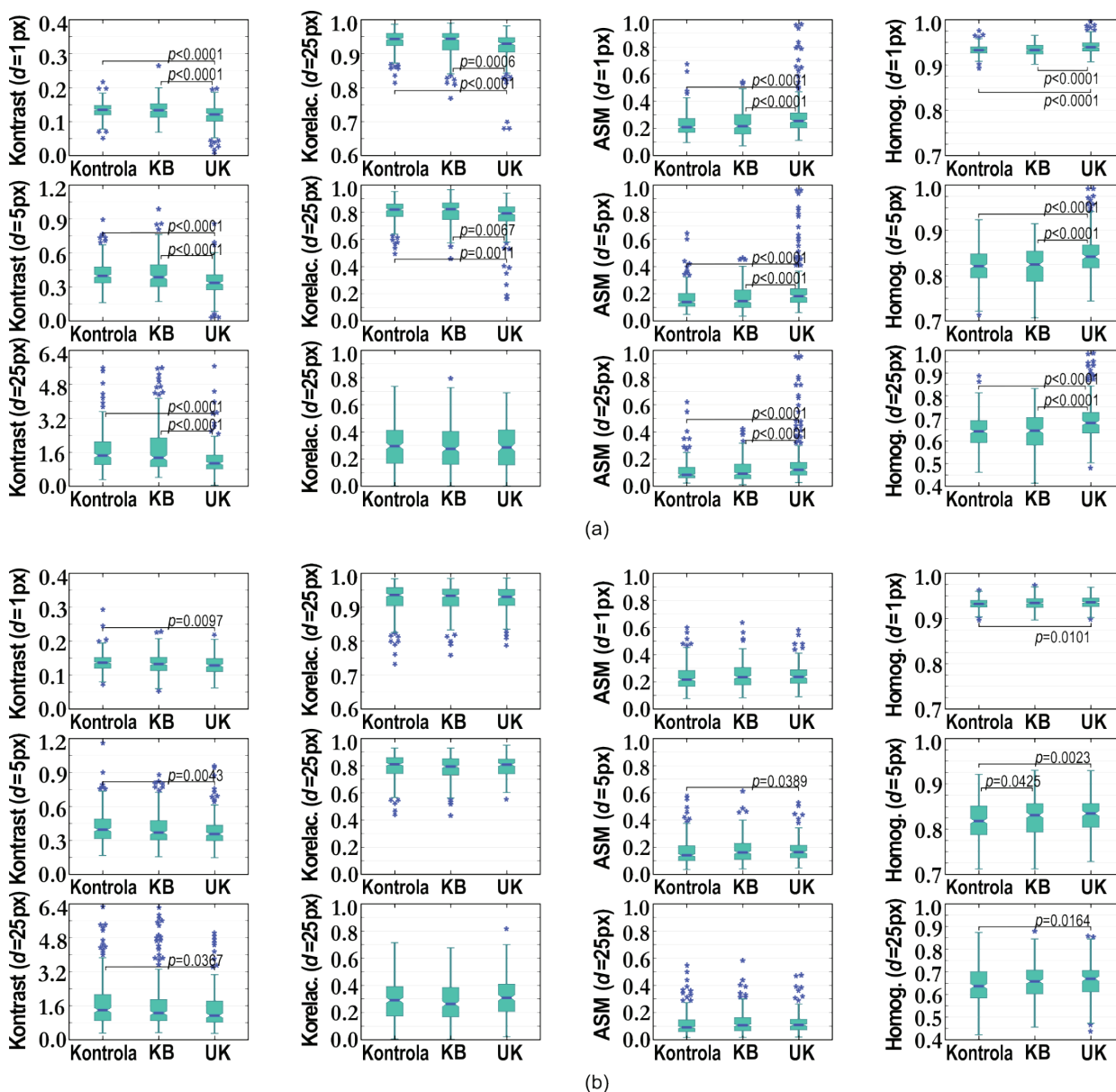
Tabela 4.3.12. Korelacija fraktalne dimenzije i lakunarnosti sa metalima u tkivu creva i endoskopskom aktivnošću.

Fraktalna dimenzija i lakunarnost-Korelacije			
Segment	Kontrola	UK	KB
S1			Mn-Frak $rs=0.893, p=0.007$; Mn-Lak $rs=-0.929, p=0.003$;
S2	K-Frak $rs=-0.709, p=0.022$; Cd-Lak $rs=-0.697, p=0.025$;	Cd-Lak $rs=0.857, p=0.014$;	Cr-Frak $rs=-0.952, p<0.0001$;
S3		Fe-Frak $rs=-0.829, p=0.042$; Fe-Lak $rs=0.943, p=0.005$; As-Lak $rs=0.812, p=0.050$;	Mn-Frak $rs=0.700, p=0.036$; Mn-Lak $rs=-0.667, p=0.050$; Cu-Frak $rs=0.767, p=0.016$; Zn-Frak $rs=0.700, p=0.036$; Zn-Lak $rs=-0.667, p=0.050$; Cd-Frak $rs=0.667, p=0.050$; Cd-Lak $rs=-0.783, p=0.013$;
S4		Cd-Lak $rs=-0.786, p=0.036$; Mayo-Frak $rs=0.655, p=0.040$;	Na-Frak $rs=0.717, p=0.030$; Na-Lak $rs=-0.783, p=0.013$; K-Lak $rs=-0.667, p=0.050$; Al-Lak $rs=-0.700, p=0.036$;
S5	Na-Frak $rs=-0.721, p=0.019$.		
S6			
S7			

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. Skraćenice: Frak – fraktalna dimenzija, Lak – lakunarnost, S1 – terminalni ileum, S2 – cekum, S3 – ascendentni kolon, S4 – transverzalni kolon, S5 – descendentni kolon, S6 – sigmoidni kolon, S7 – rektum; rs – Spirmanov koeficijent korelacije rangova.

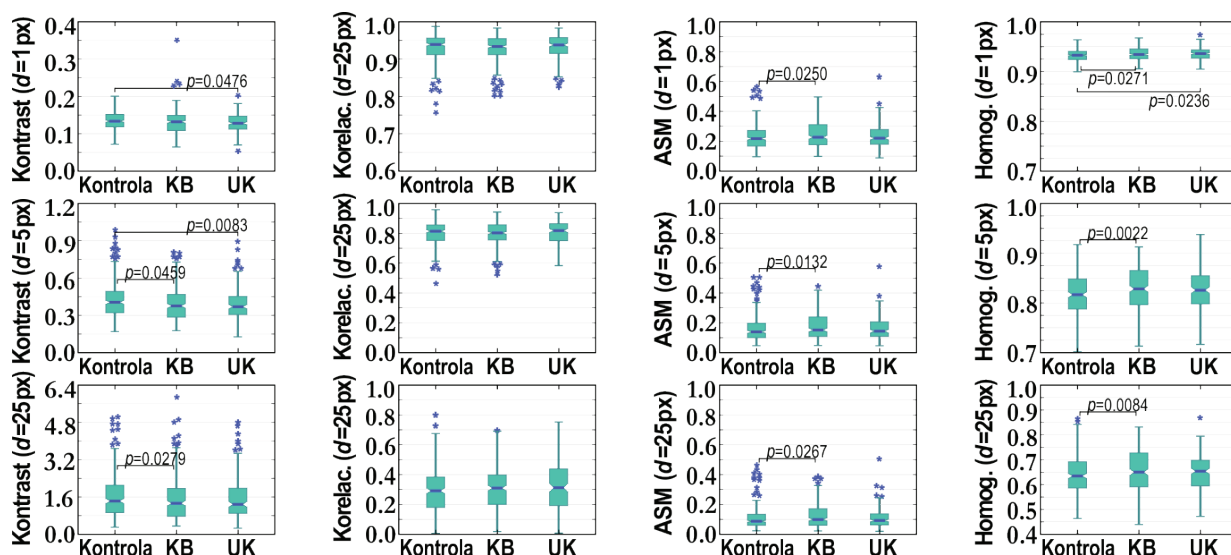
Rezultati GLCM teksturalne analize jedara crevnih ćelija dece obolele od KB, UK i kontrolne grupe dece prikazani su na slikama 4.3.5, 4.3.6, i 4.3.7. Kada posmatramo četiri određivana parametra zajedno, najubedljiviji rezultati dobijeni su za terminalni deo ileuma. U ovom delu creva praktično svaki parametar GLCM analize koji smo određivali uspevao je da razdvoji obolele sa dijagnozom UK od druge dve ispitivane grupe i to gotovo uvek za sve tri ispitivane vrednosti d ($p \leq 0.0067$). No, ne puno različita situacija bila je i u sigmoidnom kolonu gde su kontrast, ugaoni moment drugog reda (ASM) i homogenost razlikovali obolele od UK od kontrola ($p \leq 0.072, p \leq 0.032, p \leq 0.0064$) (osim ASM za $d=25px$) i obolelih od KB ($p \leq 0.0008, p \leq 0.0459, p \leq 0.003$) i u ascendentnom kolonu u kome su ovi parametri diferencirali obolele od KB od kontrola ($p \leq 0.046, p \leq 0.027, p \leq 0.027$) (osim kontrasta za $d=1px$). Nadalje, kontrast i homogenost, a u nekim slučajevima i ASM (za $d=5px$) statistički značajno su se razlikovali između UK grupe i kontrola i u cekumu ($p \leq 0.0097, p \leq 0.0164, p \leq 0.0389$), a kontrast (osim za $d=25px$) i homogenost i u rektumu ($p \leq 0.0175, p \leq 0.020$). Rektum je bio značajan segment i za razlikovanje KB od kontrolne grupe (statistički značajna razlika postojala je: kontrast osim $d=25px$, korelacija i homogenost osim $d=25px$). Neki delovi creva, ipak, nisu imali skoro nikakav značaj u GLCM analizi jedara naših ispitanika. Tako su transverzalni i descendentni deo kolona pokazali razliku samo između UK i KB

grupe za $d=1\text{px}$ u kontrastu ($p=0.0272$, $p=0.0382$) i homogenosti ($p=0.046$, $p=0.0219$). Interesantno, GLCM parametar korelacija se za jedra kolona nije pokazala naročito značajnom, budući da su statistički značajne razlike retko detektovane. Poređenje između segmenata u okviru tri ispitivane grupe dato je u tabelama 4.3.13, 4.3.14, i 4.3.15.



Slika 4.3.5. Poređenje kontrasta, korelacije, ASM i homogenosti između KB, UK i kontrolne grupe: a) terminalni ileum, b) cekum; korišćen je *Kruskal Wallis* H test.

Skraćenice: KB – Kronova bolest, UK – ulcerozni kolitis, ASM - *angular second moment* - ugaoni moment drugog reda



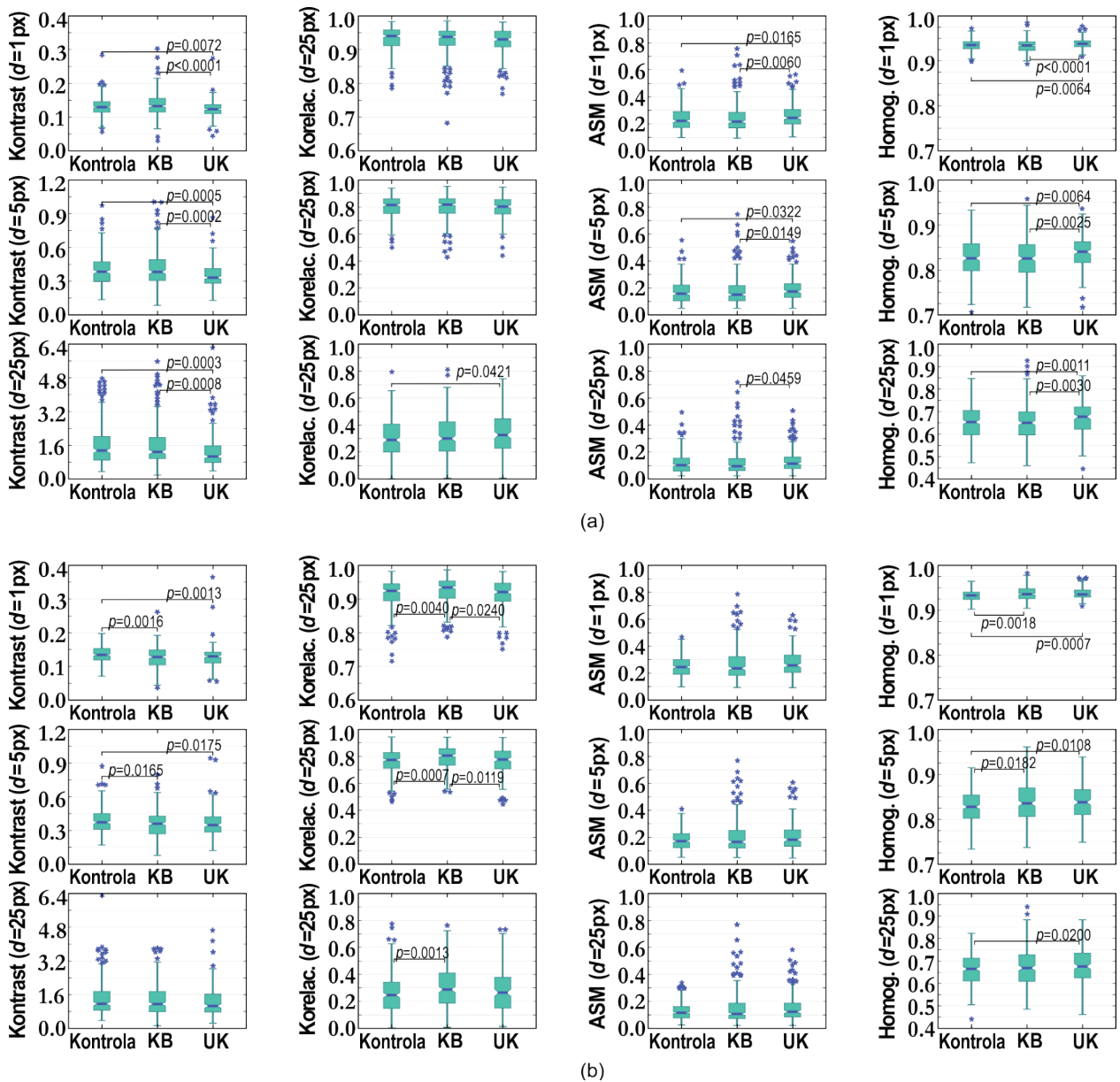
Slika 4.3.6. Poređenje kontrasta, korelacije, ASM i homogenosti između KB, UK i kontrolne grupe: ascendentni kolon. Za statističku analizu je korišćen *Kruskal-Wallis-H* test.

Skraćenice: KB – Kronova bolest, UK – ulcerozni kolitis, ASM - *angular second moment* - ugaoni moment drugog reda

Tabela 4.3.13. Poređenje kontrasta, korelacije, ASM i homogenosti među crevnim segmentima u kontrolnoj grupi

GLCM parametar	Segmenti creva (S1–S7)							Statistička značajnost
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	
<i>Con</i> ($d=1$ px)	0.135 [0.051,0.216]	0.136 [0.073,0.292]	0.134 [0.072,0.201]	0.132 [0.069,0.236]	0.128 [0.047,0.255]	0.129 [0.057,0.283]	0.134 [0.071,0.399]	S2–S5 ($p=0.044$) S2–S6 ($p=0.048$)
<i>Con</i> ($d=5$ px)	0.398 [0.161,0.898]	0.395 [0.167,1.157]	0.404 [0.168,0.985]	0.385 [0.166,0.816]	0.373 [0.136,0.908]	0.384 [0.134,0.977]	0.373 [0.171,1.486]	---
<i>Con</i> ($d=25$ px)	1.449 [0.311,5.584]	1.394 [0.310,8.011]	1.426 [0.310,5.037]	1.350 [0.324,6.292]	1.241 [0.310,7.030]	1.351 [0.351,4.771]	1.166 [0.368,6.317]	S1–S7 S2–S7 S3–S7 S5–S7 ($p<0.014$)
<i>Cor</i> ($d=1$ px)	0.943 [0.813,0.987]	0.936 [0.730,0.984]	0.940 [0.756,0.988]	0.938 [0.781,0.988]	0.937 [0.780,0.985]	0.940 [0.785,0.984]	0.924 [0.716,0.982]	S1–S2 S1–S7 S2–S7 S3–S7 S4–S7 S5–S7 S6–S7 ($p<0.006$)
<i>Cor</i> ($d=5$ px)	0.820 [0.494,0.953]	0.811 [0.442,0.930]	0.814 [0.465,0.958]	0.811 [0.488,0.960]	0.812 [0.408,0.942]	0.815 [0.502,0.940]	0.773 [0.464,0.944]	S1–S7 S2–S7 S3–S7 S4–S7 S5–S7 S6–S7 ($p<0.005$)
<i>Cor</i> ($d=25$ px)	0.296 [0.001,0.736]	0.291 [0.005,0.715]	0.292 [0.003,0.801]	0.273 [0.005,0.768]	0.287 [0.002,0.788]	0.290 [0.002,0.797]	0.246 [0.002,0.774]	S1–S7 ($p=0.005$) S6–S7 ($p=0.020$)
<i>ASM</i> ($d=1$ px)	0.209 [0.096,0.672]	0.217 [0.078,0.602]	0.217 [0.095,0.563]	0.215 [0.105,0.627]	0.223 [0.082,0.667]	0.222 [0.098,0.597]	0.245 [0.098,0.470]	S1–S7 ($p=0.007$) S3–S7 ($p=0.007$)
<i>ASM</i> ($d=5$ px)	0.138 [0.047,0.646]	0.141 [0.036,0.578]	0.139 [0.046,0.505]	0.147 [0.054,0.577]	0.156 [0.041,0.653]	0.157 [0.049,0.555]	0.171 [0.051,0.409]	S3–S7 ($p=0.017$)
<i>ASM</i> ($d=25$ px)	0.084 [0.024,0.621]	0.091 [0.016,0.550]	0.088 [0.024,0.465]	0.095 [0.028,0.509]	0.097 [0.019,0.622]	0.103 [0.023,0.492]	0.115 [0.025,0.339]	S3–S7 ($p=0.023$)
<i>Hom</i> ($d=1$ px)	0.933 [0.894,0.974]	0.932 [0.897,0.963]	0.933 [0.899,0.964]	0.934 [0.906,0.966]	0.936 [0.901,0.977]	0.935 [0.897,0.972]	0.933 [0.903,0.964]	S2–S5 S2–S6 S3–S5 ($p=0.011$)
<i>Hom</i> ($d=5$ px)	0.821 [0.713,0.924]	0.818 [0.691,0.921]	0.817 [0.699,0.917]	0.825 [0.717,0.917]	0.831 [0.702,0.935]	0.826 [0.707,0.933]	0.828 [0.698,0.915]	S3–S6 ($p=0.023$) S3–S7 ($p=0.019$)
<i>Hom</i> ($d=25$ px)	0.642 [0.462,0.890]	0.637 [0.422,0.874]	0.635 [0.464,0.865]	0.645 [0.473,0.854]	0.655 [0.437,0.894]	0.653 [0.473,0.847]	0.665 [0.439,0.823]	S1–S7 S2–S7 S3–S7 ($p<0.043$)

Skraćenice: GLCM - *Gray level co-occurrence matrix*, S1 - terminalni ileum, S2 - cekum, S3 - ascendentni kolon, S4 - transversalni kolon, S5 - descendentni kolon, S6 - sigmoidni kolon, S7 – rektum, *Con* – kontrast, *Cor* – korelacija, *ASM* - *Angular Second Moment* - ugaoni moment drugog reda, *Hom* – homogenost. Statistička analiza-Kruskal-Wallis-H test.



Slika 4.3.7. Poređenje kontrasta, korelacije, ASM i homogenosti između KB, UK i kontrolne grupe: a) sigmoidni kolon b) rektum; Statistička analiza-Kruskal-Wallis-H test.

Skraćenice: KB – Kronova bolest, UK – ulcerozni kolitis, ASM - *angular second moment* - ugani moment drugog reda

Tabela 4.3.14. Poređenje kontrasta, korelacije, ASM i homogenosti među crevnim segmentima kod pacijenata obolelih od UK

GLCM parametar	Segmenti creva (S1–S7)							Statistička značajnost
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	
<i>Con</i> ($d=1$ px)	0.121 [0.008,0.197]	0.128 [0.062,0.218]	0.128 [0.053,0.202]	0.130 [0.058,0.325]	0.127 [0.055,0.256]	0.123 [0.045,0.275]	0.130 [0.057,0.366]	S1–S2 ($p=0.022$) S1–S3 ($p=0.017$) S1–S3 ($p=0.002$)
<i>Con</i> ($d=5$ px)	0.336 [0.015,0.865]	0.357 [0.147,0.959]	0.368 [0.125,0.892]	0.371 [0.190,1.113]	0.354 [0.127,0.889]	0.331 [0.128,0.869]	0.349 [0.122,1.283]	S1–S4 ($p=0.009$) S3–S6 ($p=0.021$) S1–S3 ($p=0.003$) S1–S4 S3–S6 S3–S7 ($p<0.026$)
<i>Con</i> ($d=25$ px)	1.080 [0.019,5.649]	1.137 [0.296,6.630]	1.285 [0.266,6.654]	1.232 [0.403,6.563]	1.159 [0.306,6.104]	1.070 [0.381,6.246]	1.061 [0.238,7.208]	S1–S3 ($p=0.003$) S1–S4 S3–S6 S3–S7 ($p<0.026$)
<i>Cor</i> ($d=1$ px)	0.930 [0.679,0.982]	0.930 [0.786,0.986]	0.938 [0.825,0.984]	0.937 [0.770,0.984]	0.934 [0.845,0.983]	0.930 [0.767,0.982]	0.921 [0.751,0.981]	S3–S7 ($p<0.001$) S4–S7 ($p=0.017$) S3–S7 ($p<0.001$)
<i>Cor</i> ($d=5$ px)	0.792 [0.162,0.941]	0.808 [0.555,0.951]	0.818 [0.584,0.938]	0.802 [0.457,0.954]	0.806 [0.610,0.953]	0.803 [0.441,0.949]	0.777 [0.445,0.941]	S5–S7 ($p=0.041$) S6–S7 ($p=0.043$) S4–S6 ($p=0.014$) S6–S7 ($p=0.002$)
<i>Cor</i> ($d=25$ px)	0.287 [0.004,0.689]	0.309 [0.021,0.817]	0.312 [0.001,0.752]	0.264 [0.003,0.768]	0.316 [0.020,0.748]	0.326 [0.007,0.745]	0.265 [0.014,0.732]	S4–S6 ($p=0.014$) S6–S7 ($p=0.002$) S1–S3 ($p<0.001$) S3–S6 ($p=0.044$) S3–S7 ($p<0.001$)
<i>ASM</i> ($d=1$ px)	0.255 [0.112,0.968]	0.237 [0.091,0.581]	0.220 [0.087,0.634]	0.237 [0.117,0.522]	0.236 [0.103,0.553]	0.244 [0.103,0.567]	0.257 [0.092,0.632]	S1–S3 S3–S7 ($p<0.001$) S1–S4 S3–S6 ($p<0.020$) S4–S7 ($p=0.048$) S1–S3 S3–S7 ($p<0.001$)
<i>ASM</i> ($d=5$ px)	0.182 [0.061,0.967]	0.164 [0.047,0.525]	0.144 [0.046,0.580]	0.164 [0.065,0.492]	0.165 [0.051,0.523]	0.173 [0.050,0.545]	0.182 [0.045,0.609]	S1–S4 S3–S6 ($p<0.020$) S4–S7 ($p=0.048$) S1–S3 S3–S7 ($p<0.001$)
<i>ASM</i> ($d=25$ px)	0.121 [0.027,0.963]	0.109 [0.020,0.477]	0.093 [0.020,0.507]	0.104 [0.031,0.426]	0.106 [0.026,0.472]	0.114 [0.023,0.506]	0.123 [0.021,0.581]	S3–S6 S4–S7 ($p<0.024$) S1–S4 ($p=0.048$) S1–S2 ($p=0.023$) S1–S3 ($p=0.023$) S1–S4 ($p=0.041$) S1–S3 S1–S4 S3–S6 ($p<0.008$) S3–S7 ($p=0.018$) S1–S2 ($p=0.039$) S1–S3 S3–S6 S3–S7 ($p<0.007$) S1–S4 ($p=0.025$) S4–S7 ($p=0.034$)
<i>Hom</i> ($d=1$ px)	0.939 [0.907,0.996]	0.936 [0.897,0.969]	0.936 [0.905,0.973]	0.935 [0.906,0.971]	0.937 [0.902,0.972]	0.938 [0.910,0.978]	0.935 [0.903,0.972]	S1–S2 ($p=0.023$) S1–S3 ($p=0.023$) S1–S4 ($p=0.041$) S1–S3 S1–S4 S3–S6 ($p<0.008$) S3–S7 ($p=0.018$) S1–S2 ($p=0.039$) S1–S3 S3–S6 S3–S7 ($p<0.007$) S1–S4 ($p=0.025$) S4–S7 ($p=0.034$)
<i>Hom</i> ($d=5$ px)	0.842 [0.744,0.993]	0.835 [0.694,0.929]	0.825 [0.717,0.938]	0.830 [0.723,0.911]	0.835 [0.698,0.937]	0.841 [0.718,0.936]	0.838 [0.705,0.939]	S1–S2 ($p=0.039$) S1–S3 S3–S6 S3–S7 ($p<0.007$) S1–S4 ($p=0.025$) S4–S7 ($p=0.034$)
<i>Hom</i> ($d=25$ px)	0.680 [0.483,0.991]	0.669 [0.438,0.859]	0.654 [0.472,0.868]	0.659 [0.485,0.820]	0.667 [0.442,0.848]	0.677 [0.446,0.859]	0.675 [0.462,0.883]	S1–S2 ($p=0.039$) S1–S3 S3–S6 S3–S7 ($p<0.007$) S1–S4 ($p=0.025$) S4–S7 ($p=0.034$)

Skraćenice: GLCM - *Gray level co-occurrence matrix*, S1 - terminalni ileum, S2 - cekum, S3 - ascendentni kolon, S4 - transversalni kolon, S5 - descendentni kolon, S6 - sigmoidni kolon, S7 - rektum, *Con* - kontrast, *Cor* - korelacija, *ASM* - *Angular Second Moment* - ugaoni moment drugog reda, *Hom* - homogenost. Statistička analiza-Kruskal-Wallis-H test.

Koreliranje kliničkih, hematoloških i biohemijskih parametara sa GLCM teksturalnim parametrima urađeno je na isti način kao i kod morfometrijske i fraktalne analize. Za sve studije korelacije uzete su vrednosti GLCM teksturalnih parametara samo za $d=5$. Ova vrednost je izabrana s obzirom da je na ovom rastojanju među pikselima postojao veliki broj statistički značajnih razlika u GLCM parametrima među ispitivanim grupama. Značajne korelacije bile su prisutne samo kod obolelih od KB (tabela 4.3.16). Kod ovih pacijenata što je broj granulocita bio veći i kontrast u jedrima creva bio je veći ($r_s=0.851$, $p<0.0001$), a homogenost i uniformnost (*ASM*) ovih jedara manja ($r_s=-0.744$, $p=0.002$, $r_s=-0.836$, $p<0.0001$; respektivno). Veći broj trombocita i njihova manja veličina uslovljavali su veći kontrast u jedrima enterocita ($r_s=0.543$, $p=0.045$, $r_s=-0.562$, $p=0.037$; respektivno) i bolju korelaciju ($r_s=0.591$, $p=0.026$, $r_s=-0.535$ $p=0.049$; respektivno) među njihovim pikselima.

Veći broj trombocita bio je praćen manje homogenim jedrima creva ($rs=-0.556$, $p=0.039$), a viši *ASM* povezan je sa manjim trombocitima ($rs=0.548$, $p=0.042$).

Tabela 4.3.15. Poređenje kontrasta, korelacije, *ASM* i homogenosti među crevnim segmentima kod pacijenata obolelih od KB

GLCM parametar	Segmenti creva (S1–S7)							Statistička značajnost
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	
<i>Con</i> ($d=1$ px)	0.134 [0.069,0.265]	0.133 [0.053,0.229]	0.132 [0.065,0.351]	0.136 [0.045,0.496]	0.135 [0.033,0.246]	0.133 [0.031,0.388]	0.128 [0.035,0.401]	---
<i>Con</i> ($d=5$ px)	0.386 [0.171,0.985]	0.370 [0.156,0.881]	0.374 [0.175,0.804]	0.397 [0.109,0.882]	0.369 [0.091,1.020]	0.382 [0.085,1.008]	0.361 [0.079,1.627]	S1–S7 ($p<0.004$) S4–S7 ($p=0.012$) S6–S7 ($p=0.025$)
<i>Con</i> ($d=25$ px)	1.344 [0.415,9.952]	1.257 [0.334,6.232]	1.331 [0.354,5.869]	1.495 [0.264,5.942]	1.213 [0.172,6.879]	1.288 [0.189,5.570]	1.152 [0.125,7.170]	S1–S7 ($p<0.002$) S4–S7 ($p=0.014$)
<i>Cor</i> ($d=1$ px)	0.944 [0.769,0.990]	0.934 [0.758,0.985]	0.934 [0.803,0.984]	0.942 [0.796,0.988]	0.937 [0.780,0.980]	0.938 [0.681,0.985]	0.934 [0.787,0.986]	---
<i>Cor</i> ($d=5$ px)	0.823 [0.457,0.967]	0.794 [0.432,0.930]	0.803 [0.528,0.942]	0.821 [0.538,0.964]	0.809 [0.454,0.942]	0.818 [0.429,0.954]	0.806 [0.536,0.942]	---
<i>Cor</i> ($d=25$ px)	0.276 [0.000,0.795]	0.263 [0.001,0.677]	0.310 [0.019,0.699]	0.307 [0.013,0.859]	0.319 [0.003,0.736]	0.301 [0.007,0.808]	0.288 [0.007,0.763]	---
<i>ASM</i> ($d=1$ px)	0.216 [0.071,0.537]	0.235 [0.083,0.636]	0.226 [0.098,0.496]	0.213 [0.090,0.617]	0.225 [0.102,0.720]	0.216 [0.093,0.759]	0.236 [0.093,0.785]	S1–S7 ($p=0.041$)
<i>ASM</i> ($d=5$ px)	0.145 [0.033,0.457]	0.161 [0.040,0.615]	0.152 [0.048,0.444]	0.145 [0.054,0.601]	0.153 [0.049,0.707]	0.150 [0.049,0.747]	0.166 [0.050,0.771]	S1–S7 ($p=0.014$) S4–S7 ($p=0.026$)
<i>ASM</i> ($d=25$ px)	0.093 [0.012,0.422]	0.107 [0.018,0.583]	0.099 [0.022,0.377]	0.094 [0.025,0.576]	0.099 [0.024,0.685]	0.095 [0.023,0.718]	0.107 [0.021,0.769]	S1–S7 ($p=0.012$) S4–S7 ($p=0.020$)
<i>Hom</i> ($d=1$ px)	0.933 [0.902,0.966]	0.934 [0.897,0.974]	0.934 [0.906,0.968]	0.932 [0.896,0.977]	0.933 [0.898,0.984]	0.934 [0.893,0.985]	0.936 [0.904,0.982]	---
<i>Hom</i> ($d=5$ px)	0.825 [0.707,0.915]	0.831 [0.712,0.930]	0.828 [0.713,0.913]	0.823 [0.712,0.946]	0.830 [0.702,0.956]	0.825 [0.688,0.958]	0.836 [0.737,0.961]	S1–S7 ($p=0.004$) S4–S7 ($p=0.024$)
<i>Hom</i> ($d=25$ px)	0.645 [0.413,0.832]	0.658 [0.456,0.880]	0.650 [0.439,0.832]	0.639 [0.468,0.887]	0.654 [0.444,0.921]	0.650 [0.459,0.925]	0.668 [0.485,0.941]	S1–S7 ($p=0.004$) S4–S7 ($p=0.032$)

Skraćenice: GLCM - *Gray level co-occurrence matrix*, S1 - terminalni ileum, S2 - cekum, S3 - ascendentni kolon, S4 - transversalni kolon, S5 - descendentni kolon, S6 - sigmoidni kolon, S7 – rektum, *Con* – kontrast, *Cor* – korelacija, *ASM* - *Angular Second Moment* - ugaoni moment drugog reda, *Hom* – homogenost. Statistička analiza-Kruskal-Wallis-H test.

Tabela 4.3.16. Korelacije GLCM teksturalnih parametara sa kliničkim i hematološkim parametrima kod obolelih od KB

Varijabla	Percentil mase	Kronova bolest – korelacije		
		Granulociti	Trombociti	MPV
<i>Con</i>		$rs=0.851$, $p<0.0001$	$rs=0.543$ $p=0.045$	$rs=-0.562$ $p=0.037$
<i>Cor</i>			$rs=0.591$ $p=0.026$	$rs=-0.535$ $p=0.049$
<i>ASM</i>		$rs=-0.744$ $p=0.002$		$rs=0.548$, $p=0.042$
<i>Hom</i>	$rs=-0.582$ $p=0.037$	$rs=-0.836$ $p<0.0001$	$rs=-0.556$ $p=0.039$	

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. Skraćenice: *Con* – kontrast, *Cor* – korelacija, *ASM* - *Angular Second Moment* - ugaoni moment drugog reda, *Hom* – homogenost, MPV - mean platelet volume – srednja zapremina trombocita, rs – Spirmanov koeficijent korelacije rangova.

Korelacija GLCM teksturalnih parametara sa skorovima histološke aktivnosti (*Nancy* i *GHAS*), endoskopske aktivnosti (*Mayo* i *SES-CD*) i metalima u tkivu creva prikazana je u tabeli 4.3.17.

Tabela 4.3.17. Korelacija GLCM teksturalnih parametara sa skorovima histološke i endoskopske aktivnosti i metalima u tkivu creva.

GLCM teksturalni parametri-Korelacije			
Segment	Kontrola	UK	KB
S1	Cd-Con <i>rs</i> =0.697, <i>p</i> =0.025; Cd-ASM <i>rs</i> =-0.648, <i>p</i> =0.043; Cd-Hom <i>rs</i> =-0.709, <i>p</i> =0.022	Fe-Con <i>rs</i> =0.900, <i>p</i> =0.037; Na-ASM <i>rs</i> =-0.900, <i>p</i> =0.037; Ca-ASM <i>rs</i> =-0.900, <i>p</i> =0.037; Zn-ASM <i>rs</i> =-0.900, <i>p</i> =0.037; Fe-Hom <i>rs</i> =-0.900, <i>p</i> =0.037	
S2	Fe-Con <i>rs</i> =0.709, <i>p</i> =0.022; Fe-Hom <i>rs</i> =0.709, <i>p</i> =0.022		Fe-Con <i>rs</i> =-0.714, <i>p</i> =0.047; Cd-Con <i>rs</i> =-0.714, <i>p</i> =0.047; Al-Hom <i>rs</i> =0.738, <i>p</i> =0.037
S3		Nancy-Con <i>rs</i> =0.707, <i>p</i> =0.022; Nancy-ASM <i>rs</i> =-0.871, <i>p</i> =0.001; Nancy-Hom <i>rs</i> =-0.707; <i>p</i> =0.022	
S4	Cd-Con <i>rs</i> =0.709, <i>p</i> =0.022; Cd-Hom <i>rs</i> =-0.636, <i>p</i> =0.048; Al-Cor <i>rs</i> =0.830, <i>p</i> =0.003		
S5		Nancy-Con <i>rs</i> =0.780, <i>p</i> =0.008; Nancy-ASM <i>rs</i> =-0.741, <i>p</i> =0.014; Nancy-Hom <i>rs</i> =-0.702, <i>p</i> =0.024	Mg-Hom <i>rs</i> =0.667, <i>p</i> =0.050; K-Con <i>rs</i> =-0.700, <i>p</i> =0.036; K-Hom <i>rs</i> =0.733, <i>p</i> =0.025; Zn-Con <i>rs</i> =-0.717, <i>p</i> =0.030; Zn-Hom <i>rs</i> =0.733, <i>p</i> =0.025
S6		Mg-Con <i>rs</i> =-0.893, <i>p</i> =0.007; Mg-Hom <i>rs</i> =0.893, <i>p</i> =0.007; Cu-Con <i>rs</i> =-0.857, <i>p</i> =0.014; Cu-ASM <i>rs</i> =0.786, <i>p</i> =0.036; Cu-Hom <i>rs</i> =0.857, <i>p</i> =0.014	K-Con <i>rs</i> =0.683, <i>p</i> =0.042; K-ASM <i>rs</i> =-0.717, <i>p</i> =0.030; K-Hom <i>rs</i> =-0.683, <i>p</i> =0.042 Ca-ASM <i>rs</i> =-0.700, <i>p</i> =0.036
S7			Ca-Con <i>rs</i> =-0.810, <i>p</i> =0.015; Ca-Hom <i>rs</i> =0.762, <i>p</i> =0.028; Cd-Con <i>rs</i> =-0.786, <i>p</i> =0.021; GHAS-Cor <i>rs</i> =0.550, <i>p</i> =0.042
Srednja vrednost GLCM teksturalnih parametara po pacijentu			SES-CD-Con <i>rs</i> =0.736, <i>p</i> =0.003; SES-CD- Cor <i>rs</i> =0.745, <i>p</i> =0.002; SES-CD-ASM <i>rs</i> =-0.798, <i>p</i> =0.001; SES-CD-Hom <i>rs</i> =-0.756, <i>p</i> =0.002

Prikazane su samo statistički značajne korelacije. Skraćenice: GLCM - Gray-Level Co-Occurrence Matrix, KB – Kronova bolest, UK – ulcerozni kolitis, Con – kontrast, Cor korelacija, ASM - Angular Second Moment - ugaoni moment drugog reda, Hom – homogenost, S1 - terminalni ileum, S2 - cekum, S3 - ascendentni kolon, S4 - transverzalni kolon, S5 - descendentni kolon, S6 - sigmoidni kolon, S7 – rektum, SES-CD - Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease - jednostavni endoskopski skor za KB, rs-Spirmanov koeficijent korelacije rangova

Korelacija GLCM teksturalnih parametara obolelih od KB sa parametrom oksidativnog stresa 4-HNE prikazana je u tabeli 4.3.18.

Tabela 4.3.18. Korelacija GLCM teksturalnih parametara sa parametrom oksidativnog stresa 4-HNE

Kronova bolest	4-HNE epitel	Imunohistohemijski skor
<i>Con</i>	$rs=-0.661$ $p=0.037$	
<i>Cor</i>	$rs=-0.661$ $p=0.037$	$rs=-0.732$ $p=0.016$
<i>ASM</i>	$rs=0.731$ $p=0.016$	$rs=0.751$ $p=0.012$
<i>Hom</i>	$rs=0.661$ $p=0.037$	

Imunohistohemijski skor je dobijen sabiranjem vrednosti obima ekspresije 4-HNE u epitelnim i zapaljenjskim ćelijama creva. Skraćenice: GLCM - *Gray level co-occurrence matrix*, *Con* – kontrast, *Cor* – korelacija, *ASM* - *Angular Second Moment* - ugaoni moment drugog reda, *Hom* – homogenost, *rs*- Spirmanov koeficijent korelacije rangova

4.4. Imunohistohemijska analiza oksidativnog stresa u tkivu

Oksidativni stres u tkivu procenjen je na osnovu imunohistohemijske ekspresije 4-HNE. Obim ekspresije 4-HNE (bez ekspresije, fokalna ili difuzna) u epitelnim ćelijama kripti i pokrovnog epitela creva i u zapaljenjskom infiltratu je prvo zasebno određivan. Zatim je na osnovu zbira 4-HNE ekspresije u epitelu i zapaljenjskom infiltratu dobijen i treći parametar: imunohistohemijski skor. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.4.1. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u 4-HNE ekspresiji u crevima ni u epitelu ni u zapaljenjskom infiltratu. Osim toga, imunohistohemijski skor nije se značajno razlikovao između grupa. Ipak, zanimljiv je nalaz da 4-HNE ekspresija u epitelu dece obolele od UK u ovom istraživanju nikada nije bila difuzna i da je većina dece 72.2% imala fokalnu ekspresiju. Obim ekspresije 4-HNE u epitelu kod obolelih od UK pozitivno je korelirao je sa *Geboes* skorom ($rs = 0.490$, $p=0.046$).

Tabela 4.4.1. Imunohistohemijska ekspresija 4-HNE u tkivu creva.

	Kontrola	UK	KB	<i>p</i> vrednost
4-HNE epitel				
Nema ekspresije	33.3%	27.8%	44.4%	$p=0.661$
Fokalna ekspresija	41.2%	72.2%	44.4%	
Difuzna ekspresija	23.5%	0.0%	11.1%	
4-HNE zapaljenjski infiltrat				
Nema ekspresije	52.9%	50.0%	49.1%	$p=0.892$
Fokalna ekspresija	35.3%	44.4%	41.5%	
Difuzna ekspresija	11.8%	5.6%	9.4%	
Imunohistohemijski skor				
0	35.3%	22.2%	27.8%	$p=0.904$
1	11.8%	33.3%	33.3%	
2	29.4%	38.9%	27.8%	
3	17.6%	5.6%	0.0%	
4	5.9%	0.0%	11.1%	

Imunohistohemijski skor je dobijen sabiranjem vrednosti obima ekspresije 4-HNE u epitelnim i zapaljenjskim ćelijama creva. Skraćenice: UK – ulcerozni kolitis, KB – Kronova bolest, 4-HNE - 4 *Hydroxynonenal*. Statistička analiza-Kruskal-Wallis-H test

5. DISKUSIJA

Ova studija spada u pionirske u oblastima koje obuhvata: uticaj metala na razvoj pedijatrijske forme IBD i primena kompjuterskih tehnologija na patohistološke preparate tkiva creva obolelih od ove bolesti. Osim toga, studija se bavila IBD kod dece kroz klinička, hematološka, biohemijska ispitivanja i ispitivanja oksidativnog stresa. Nadalje, studijama korelacije provereno je da li postoji povezanost među raznorodnim ispitivanim parametrima. S obzirom na sve veću učestalost IBD u dečijoj populaciji ovakve studije su neophodne radi razjašnjavanja patogeneze bolesti i uspostavljanja preciznije dijagnostike.

U ovoj studiji poredili smo vrednosti kliničkih parametara kao što su indeksi aktivnosti bolesti (klinički, endoskopski i patohistološki), telesna masa i visina, BMI između ispitivanih grupa. Takođe, među grupama smo poredili vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara koji se rutinski određuju deci oboleloj od IBD.

Srednja vrednost PCDAI pacijenata obolelih od KB bila je 19.57 ± 7.59 . Ovakva PCDAI vrednost označava blagu aktivnost bolesti (78). S druge strane, pacijenti oboleli od UK u ovom istraživanju u proseku su imali umerenu aktivnost bolesti (PUCAI 35 ± 13.94) (78).

Ova teza pokazala je da oboleli od KB i UK imaju manju masu u odnosu na uzrast (izraženo u percentilima) u poređenju sa kontrolnom grupom, dok se visina za uzrast i BMI nisu značajno razlikovali. Ipak, treba napomenuti da su deca u bolesničkim grupama imala znatno nižu visinu za uzrast nego u kontrolnoj, ali su u ovim grupama varijacije u visini za uzrast bile velike. Srednje vrednosti BMI bile su najniže kod obolelih od KB. Zastoj u rastu često postoji kod dece u trenutku postavljanja dijagnoze IBD (79), štaviše prema jednoj studiji smanjenje brzine rasta je u 46% pedijatrijskih pacijenata obolelih od KB prvi znak bolesti (80). Nadalje, oko 10-33% dece obolele od IBD nisko je rastom (visina ispod trećeg percentila) (79). Osim toga, istraživanja pokazuju da 25% dece obolele od KB ima smanjenu visinu u odrasloj dobi. Iako su podaci šturi, izgleda da je ovaj procenat niži kod obolelih od UK, mada kontroverze i dalje postoje (81). Prema jednoj studiji pokazano je da je u trenutku postavljanja dijagnoze deficit u rastu češće bio prisutan kod obolelih od KB (9%) u odnosu na kontrolnu grupu (2.8%). Međutim, u ovoj studiji, broj ispitanika obolelih od KB bio je blizu 300 (81), dok je u našoj pilot studiji njihov broj bio 20. S obzirom da je visina obolelih od KB u našoj studiji bila znatno niža nego u kontrolnoj grupi, možemo naslutiti da bi se sa porastom broja ispitanika pojavila i statistički značajna razlika. Ipak, da bi se dobio ovoliki broj pacijenata potrebna je retrospektivna studija ili multicentrična studija. Nadalje, naši pacijenti imali su u proseku blag intenzitet KB, a pokazana je povezanost ozbiljnosti bolesti i poremećaja rasta (82). Gubitak težine ubraja se u klasične simptome kojima se prezentuje IBD (83). Stoga, statistički značajno niža masa za uzrast obolelih od KB i UK u odnosu na kontrolnu grupu pokazana u našem istraživanju u skladu je sa drugim istraživanjima. Jedna studija pokazuje da osobe sa novodijagnostikovanom KB prijavljuju pad težine u 60% slučajeva, a oboleli od UK u nešto nižem procentu (35%) (84, 85). Osim manje telesne mase, osobe sa IBD, naročito oboleli od KB, obično imaju i snižen BMI (84). Jedna skorašnja studija (84) sprovedena na oboleloj deci u trenutku dijagnoze, pokazala je nizak BMI u obolelih od KB u 22-24 % obolelih, a kod UK 7-9 %. Ipak, ista studija pokazala je povećanu telesnu masu na osnovu BMI u 10% obolelih od KB i 20-30 % obolelih od UK. Ovakve promene u BMI mogu se objasniti kako epidemijom gojaznosti u opštoj populaciji, tako i ranijim postavljanjem dijagnoze (84). Nepostojanje značajne razlike u BMI u našoj studiji između ispitivanih grupa može se bar delimično objasniti ovim varijacijama, s obzirom da je u bolesničkim grupama postojao bar po jedan pacijent sa prekomernom težinom.

Uobičajeni laboratorijski nalazi prisutni kod dece obolele od IBD uključuju anemiju, trombocitozu, hipoalbuminemiju i povećanje markera zapaljenja (83). U skladu sa ovim, u našoj studiji pokazana je razlika između ispitivanih grupa u broju trombocita, serumskim

albuminima i CRP. Oboleli od KB imali su statistički značajno veći broj trombocita i viši CRP u odnosu na kontrole. Koncentracija albumina u serumu bila je značajno niža kod obolelih od UK i KB u odnosu na kontrole. Osim toga MPV bio je statistički značajno niži kod KB u odnosu na UK. S druge strane nivo hemoglobina se nije razlikovao između ispitivanih grupa.

Anemija predstavlja jednu od najčešćih komplikacija IBD, a procenat anemične dece u trenutku IBD dijagnoze kreće se između 44%-74% zavisno od studije (86). S obzirom na ove podatke, očekivali smo značajnu razliku u hemoglobinu između ispitivanih grupa sa nižim vrednostima u bolesničkim grupama. Međutim, razlika u hemoglobinu u našoj studiji je izostala, moguće zbog prosečno blage aktivnosti KB i umerene (na granici sa blagom) aktivnosti UK. Alves (2014) je sa svojom istraživačkom grupom pokazao povezanost anemije sa indeksom aktivnosti UK (87), a u studiji Laffolie et al. (2014) PUCAI i PCDAI su bili značajno veći kod anemičnih IBD pedijatrijskih pacijenata u odnosu na one sa normalnom krvnom slikom (88). Osim toga, naša studija pokazala je značajnu razliku u broju eritrocita kod obolelih od KB i UK u odnosu na kontrolnu grupu. Broj eritrocita bio je viši u bolesničkim grupama što može ukazati na kompenzaciju anemije povećanom produkcijom eritrocita u koštanoj srži.

Kliničke studije pokazale su reaktivnu trombocitozu kod IBD pacijenata, a povećanje broja trombocita predloženo je kao biomarker aktivnosti bolesti (89). Trombocitoza se smatra nespecifičnim odgovorom na zapaljenje i može se javiti i u drugim hroničnim zapaljenskim bolestima. Međutim, smatra se da je trombocitoza kod IBD posledica poremećaja u trombopoezi uzrokovanih višim nivoima IL-6 i trombopoetina koji utiču na sazrevanje megakariocita. Dakle, veći broj trombocita kod obolelih od KB u odnosu na kontrole, pokazan u ovoj tezi, je očekivan. Osim toga, trombociti kod IBD pacijenata imaju manju srednju zapreminu (MPV) nego kontrole, a izgleda da je MPV izraženije smanjen tokom aktivne faze bolesti nego u remisiji. Nadalje, MPV je predložen kao marker aktivnosti bolesti s obzirom da je pokazana njegova negativna korelacija sa markerima inflamacije (90). Delimično u skladu sa ovim istraživanjima, oboleli od KB u našoj studiji imali su značajno niži MPV u odnosu na UK.

Ova teza pokazala je da deca obolela od KB imaju značajno više granulocite (apsolutni broj) u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo bi moglo biti posledica češće incidencije običnih infekcija kod obolelih od IBD (91). Osim toga, infektivni kolitis je jedan od okidača za nastanak relapsa kod KB (92), a šansa je veća da će se pacijent javiti lekaru kada ima pogoršanje simptoma i da će mu tada biti postavljena dijagnoza.

CRP je jedan od najvažnijih pozitivnih reaktanata akutne faze. Međutim, postoji raznolikost u CRP odgovoru kod zapaljenskih bolesti, pa tako neke bolesti između ostalih KB i reumatoidni artritis dovode do izraženog porasta CRP, dok opet neke druge poput UK, Sjögrenovog sindroma i sistemskog lupusa eritematodesa pokazuju slabo izražen ili čak odsutan porast CRP (93). Ovo objašnjava statistički značajno više vrednosti CRP kod KB u odnosu na kontrolnu grupu koje su pokazane u ovoj tezi, ali i odsustvo značajne razlike između UK i kontrolne grupe.

Visok nivo fekalnog kalprotektina je veoma senzitivna (97%), ali umereno specifična (71%) za dijagnostiku IBD. Visoke vrednosti fekalnog kalprotektina moguće su i u bolestima kao što su infektivne dijareje, alergija na proteine kravljeg mleka, kolorektalni karcinomi itd. (94). Koncentracija ovog biomarkera ispod 40 µg/g kod pacijenata sa simptomima koji upućuju na sindrom iritabilnog creva povezana je sa verovatnoćom od samo 1% da je kod pacijenta zapravo u pitanju IBD (7). Naša studija potvrdila je odlične dijagnostičke karakteristike fekalnog kalprotektina pokazujući da su i oboleli od KB i oboleli od UK imali

statistički značajno više vrednosti ovog biomarkera u fecesu u odnosu na kontrole i to sa visokom značajnošću ($p=0.001$).

Nizak nivo albumina u serumu kod IBD posledica je kako smanjenog unosa proteina i relativno smanjene sinteze albumina, tako i povećanja gubitka kroz creva i poremećaja u preraspodeli između intra- i ekstravaskularnog odeljka (95). Albumini su u našoj studiji bili jedan od retkih parametara koji je statistički značajno bio snižen i kod UK i kod KB u odnosu na kontrole. Značaj albumina za UK potkrepljuje i studija koja pokazuje da je niži nivo albumina u serumu u trenutku dijagnoze bolesti povezan sa ozbiljnijim tokom bolesti (96).

S obzirom na to da je naša studija rađena u dečijoj populaciji, treba napomenuti da je jedno istraživanje pokazalo da su fekalni kalprotektin i CRP bili viši, a albumin niži kod dece obolele od KB nego kod odraslih u trenutku početka biološke terapije, dok je ovo važno samo za albumin kada je UK u pitanju (97). Izraženije promene ovih parametara u dečijoj populaciji verovatno su još više naglasile gore navedene statistički značajne razlike koje je naša studija detektovala.

Posmatrajući rezultate dobijene za albumin i CRP naša studija je u skladu sa istraživanjem koje je pokazalo da u dečijoj populaciji upravo ovi markeri u kombinaciji (uz brzinu sedimentacije) mogu izdvojiti decu sa povišenim kalprotektinom i mogućom KB od dece kojoj je fekalni kalprotektin bio povišen iz drugih razloga. Osim toga, kao i u našoj studiji i u ovoj su se za UK pokazali kao značajni parametri samo fekalni kalprotektin i albumini (94).

Studija koja je analizirala prevalenciju hipoholesterolemije kod hospitalizovanih pacijenata pokazala je da je IBD jedna od bolesti gde je ovakav laboratorijski nalaz češći (98). Nadalje, zaključak meta analize koja se bavila analizom vrednosti holesterola kod IBD pacijenata je da oboleli od IBD imaju značajno niže vrednosti ukupnog i LDL holesterola što je naglašenije kod KB. Međutim, prema ovoj studiji u nivou triglicerida i HDL holesterola nije bilo promena u odnosu na zdravu populaciju (98). Naši rezultati su delimično saglasni sa ovom studijom s obzirom da smo mi pokazali značajno sniženje ukupnog holesterola u odnosu na kontrolnu grupu i kod obolelih od UK i kod obolelih od KB. Osim toga i LDL holesterol je bio u proseku viši u kontrolnoj u odnosu na bolesničke grupe iako nije detektovana značajna razlika. Ipak, u našem istraživanju pokazane su značajno niže vrednosti i HDL holesterola kod KB u odnosu na kontrolnu grupu. Neke studije slično kao i naša pokazale su sniženje i HDL holesterola kod IBD pacijenata (99, 100). Za nas je najvažnija studija (101) koja je kao i naša sprovedena na dečijoj populaciji. Međutim, ova studija je samo delimično u skladu sa našom. Naime, baš kao i mi i ova studija detektovala je smanjenje ukupnog holesterola kod dece obolele od KB. S druge strane, u ovom istraživanju za razliku od našeg oboleli od KB imali su snižene vrednosti LDL holesterola i više vrednosti triglicerida u odnosu na kontrole, dok razlika u HDL holesterolu nije detektovana (101). S obzirom da je ova studija sprovedena na sličnom broju pacijenata kao i naša, moguće da su razlike koje postoje posledica toga što ova studija za razliku od naše nije sprovedena na pacijentima u trenutku dijagnoze, te su različiti faktori poput lekova ili komplikacija mogli imati uticaj. Osim toga, ova studija je sprovedena u Kanadi te bi i razlika u životnim navikama i ishrani između Srbije i Kanade mogla imati uticaj. Hipoholesterolemija je čest nalaz u akutnim bolestima (npr. operacija, trauma, opekotine i sepsa) i povezuje se sa ozbiljnošću bolesti. Razlog ovih abnormalnosti u lipidnom statusu mogao bi delimično biti objašnjen uticajem hemokina na metabolizam lipida (98). Aozaki je sugerisao da poremećaji metabolizma lipida kod KB dovode do poremećaja fluidnosti i time i funkcije membrane eritrocita i drugih ćelija te ovi poremećaji mogu biti važni za patogenezu bolesti (102).

Kreatin je važna komponenta za održavanje energetske homeostaze posebno u tkivima u kojima postoje visoki zahtevi za energijom kao što su mozak, skeletna miškulatura, ali i creva. Uloga kreatina i enzima kreatin kinaze je u prenosu energije u obliku fosfokreatina sa mesta proizvodnje energije na mesta potrošnje u ćeliji. Pokazano je da je citosolna kreatin kinaza koncentrisana oko apikalnih adherentnih spojeva intestinalnih ćelija i da farmakološka inhibicija kreatin kinaze značajno remeti pravljenje apikalnih spojeva i integritet crevne barijere. Poremećaj crevne barijere je važan u patogenezi IBD. Važno je i saznanje da je intestinalna ekspresija mitohondrijalnog i citosolnog enzima kreatin kinaze smanjena u kliničkim biopsijama IBD pacijenata. Osim toga, u upaljenom tkivu creva IBD pacijenata postoje i sniženi nivoi ATP. Smanjena ekspresija enzima kreatin kinaze kod IBD pacijenata ukazuje da je crevni metabolizam kreatina i energetska funkcija fosfokreatina i kreatin kinaze poremećena bar u jednom delu IBD pacijenata (103). Nadalje, pokazan je porast ovog enzima kod IBD pacijenata nakon biološke terapije (104). Osim toga, studija na miševima u kojoj je kolitis izazivan administracijom DSS, pokazala je da nedostatak kreatin kinaze uzrokuje težu kliničku sliku kolitisa (105). Naše istraživanje koje je pokazalo razliku u koncentraciji enzima kreatin kinaze u serumu između ispitivanih grupa, sa najnižim vrednostima ovog enzima kod obolelih od KB i najvećom razlikom u ispitivanom enzimu između UK i KB grupe, delimično je u skladu sa ovim istraživanjima. Naime, s obzirom na postojanje razlike i naša studija ukazuje na moguću važnost kreatin kinaze u patogenezi IBD, ali samo kada je KB u pitanju. S druge strane oboleli od UK imali su najviše vrednosti ovog enzima. Ova činjenica je moguća posledica prisustva makro kreatin kinaze tip 1 koja predstavlja kompleks ovog enzima i imunoglobulina. Postojanje ovog makroenzima može dati lažno povišene vrednosti kreatin kinaze. Naime, pokazana je povezanost ovog makroenzima i UK, ali ne i KB (106). Ovakav molekul detektovan je i kod pedijatrijskih UK pacijenata (107).

Naša studija pokazuje značajne promene u statusu oligoelemenata u serumu, sluznici ileuma i debelog creva dece obolele od IBD. U grupi dece obolele od IBD i KB u odnosu na kontrole došlo je do značajne redukcije serumskog gvožđa slično kao u studijama drugih istraživačkih grupa (44, 49, 108). Zanimljivo je, da s druge strane, naši rezultati ne pokazuju razlike među ispitivanim grupama u koncentraciji gvožđa u tkivu creva. Ovo poslednje, razlikuje se u odnosu na rezultate koje je dobila grupa istraživača predvođena Lih-Brody (1996) koji pokazuju više nivoa gvožđa u sluznici IBD pacijenata, mada u obolelih od KB ova razlika nije postojala između upaljene i kontrolne sluznice ovih pacijenata (109). Slično, u jednoj drugoj studiji Sturniolo i njegove kolege (1998) dobili su da je nivo gvožđa povećan u upaljenim delovima descendnog kolona u odnosu na njegove neupaljene delove kod obolelih sa dijagnozom proktosigmoiditisa u okviru UK (108). Iako u našoj studiji nisu pronađene statistički značajno više vrednosti gvožđa u tkivu creva kod obolelih, mi jesmo pronašli da su u nekim crevnim segmentima viši nivoi gvožđa bili povezani sa jačom upalom i aktivnijom bolešću kod dece sa IBD. Tačnije, nivo gvožđa u tkivu ascendentnog i sigmoidnog kolona obolelih od UK pozitivno je korelirao sa zapaljenskim parametrima, a u descendentnom i sigmoidnom kolonu obolelih od KB i sa stepenom aktivnosti bolesti. Nadalje, gvožđe u tkivu creva kod obolelih od UK pokazalo je pozitivnu korelaciju sa parametrima oksidativnog stresa (obimom ekspresije 4-HNE u tkivu i imunohistohemijskim skorom). U skladu sa našim rezultatima je i studija na animalnom IBD modelu (upali debelog creva izazvanoj dekstran sulfat natrijumom) u kojoj je oralno dato gvožđe povećavalo aktivnost kolitisa (110). Osim toga, i studija sprovedena na zdravim pacovima pokazala je da je gvožđe dato u visokoj koncentraciji tokom jednog meseca dovodilo do oksidativnog stresa, zapaljenja u debelom crevu, poremećaja epitelne barijere creva i menjalo je crevnu mikrobiotu (111). Stoga, oštećenje creva gvožđem na način pokazan u ovoj studiji, a kroz aktivaciju Fentonove reakcije (112) i povećanje zapaljenja u crevima, što sve može voditi

jačoj aktivnosti IBD, potencijalno objašnjava dobijene rezultate u našoj studiji. Nadalje, pokazana je negativna korelacija hemoglobina u krvi obolelih od KB i nivoa gvožđa u njihovom descendntnom kolonu. Ova činjenica ne iznenađuje, s obzirom da povećan nivo gvožđa u crevima ovih pacijenata može biti posledica krvarenja u crevima.

Koncentracija mangana u serumu značajno se razlikovala u tri ispitivane grupe (KB, UK i kontrola). Nivo mangana u serumu bio je najviši kod obolelih od UK, a najniži kod obolelih od KB. Nadalje, postojala je negativna korelacija (srednjeg nivoa) ovog elementa i gvožđa u serumu. Ova dva metala koriste isti transportni sistem za resorpciju u crevima [(transporter divalentnih metala 1 (*Divalent Metal Transporter-1* - DMT-1) i transferin] (113). Osim toga, kod dece sa anemijom usled deficita gvožđa, povišen nivo mangana u serumu je čest nalaz (114). Stoga, bi upravo niže gvožđe kod obolelih od UK dobijeno u ovoj studiji moglo biti uzrok viših vrednosti mangana kod ovih pacijenata i negativne korelacije između mangana i gvožđa. U nekoj meri naši rezultati su u saglasnosti sa studijom koju su sprovedli Cho i njegova grupa (2018) koji su određivali elemente u kosi dece obolele od IBD i pokazali da postoji razlika u nivou Mn u kosi ove dece među ispitivanim grupama (KB, UK i kontrolna grupa) sa ustanovljenim nižim vrednostima u IBD grupama (49). Međutim, jedna nedavno sprovedena studija nije našla razliku u serumskom manganu između obolelih i kontrola (44).

Rezultati ove teze ukazuju na moguću ulogu Mn u razvoju KB. Naime, nekoliko nedavno sprovedenih studija povezalo je IBD patogenezu sa manjkom mangana. Jedna od ovih studija (115) povezala je deficit Mn sa porastom u nivou intestinalnog zapaljenja, oksidativnog stresa i propustljivosti epitela creva na modelu kolitisa glodara. Porast oksidativnog stresa mogao bi se objasniti smanjenom aktivnošću antioksidativnog enzima Mn superoksid dizmutaze, potvrđenom u ovoj studiji. Nadalje, deficit mangana uzrokovao je smanjene ekspresije određenih gena za proteine tesnih veza (115). U drugoj studiji (116), deficit Mn kod miša bio je uzrok poremećaja epitelne barijere. Deficit ovog metala je dovodio do poremećaja mukusnog sloja sa prolaskom komensala creva u unutrašnji mukusni sloj što je posledično vodilo u zapaljenje (116). Zatim, GWAS i studije koje su podrazumevale sekvenciranje egzoma pokazale su da je jedan od gena rizika za KB, transporter Mn (i drugih metala – Zn, Fe, Cd) – ZIP8 tj. njegova *missense* varijanta. Gubitak funkcije ovog gena dovodi do hipomagnezije, kako kod ljudi tako i kod miševa, dok ostali metali ostaju nepromenjeni (116). Stoga, moguće je da na ovaj način snižen Mn kod dece obolele od KB, što je pronađeno u našoj studiji [u serumu, ileumu (statistički značajno sniženje) i skoro svakom segmentu kolona (osim ascendentnog kolona)] dovodi do povećanja propustljivosti epitelne barijere i pogoršanja zapaljenja creva. Negativan uticaj sniženog Mn na patogenezu KB dobio je podršku i na osnovu naših rezultata iz studija korelacije. Postojala je negativna korelacija između serumskog Mn i Mn descendntnog kolona i PCDAI kod obolelih od KB. Iz svega navedenog zaključujemo da naši rezultati podržavaju ulogu sniženog Mn u patogenezi KB.

U ovoj tezi pokazali smo statistički značajno različite koncentracije serumskog bakra između KB, UK i kontrolne grupe. Najviše vrednosti bakra u serumu imala su deca obolela od KB, a najniže deca obolela od UK. Razlika između UK i KB i u poređenju između grupa ($p=0.056$) bila je relativno bliska statistički značajnoj. Zanimljivo je i to da je kod obolelih od UK postojala pozitivna korelacija bakra sa fekalnim kalprotektinom. Dve studije sprovedene na deci, takođe, pokazuju više nivoe serumskog bakra u obolelih od KB (44, 117). Treba napomenuti, međutim, da jedna od ovih studija (44) pokazuje statistički značajno povećane vrednosti i u UK grupi, mada je i u ovoj studiji razlika više bila izražena kod KB. U jednoj studiji, kod odraslih IBD pacijenata pronađene su povećane vrednosti bakra u svim podgrupama (118), dok je druga studija u ovoj populaciji pokazala povećanje samo kod žena

sa IBD (119). Osim toga u reumatoidnom artritisu, takođe zapaljenskoj bolesti, pronađene su povećane vrednosti bakra (120). Visoke vrednosti bakra koje smo dobili, a koje su pokazane i u drugim studijama su razumljive s obzirom da je bakar generalno povećan kod sistemskog zapaljenja (121, 122). S obzirom na povezanost povišenog bakra sa zapaljenjem pozitivna korelacija između bakra i fekalnog kalprotektina kod UK takođe je logična.

Kod dece obolele od KB postojala je negativna korelacija (statistički značajna) između serumskog bakra i gvožđa. Ova korelacija mogla bi se objasniti statistički značajno nižim vrednostima serumskog Fe kod obolelih od KB u odnosu na kontrole budući da neke studije sugerišu da postoji pojačana apsorpcija bakra kod anemije nastale usled nedostatka gvožđa (123). Osim toga, bakar-zavisni enzimi pomažu apsorpciju bakra u crevima i njegovo otpuštanje iz tkiva (124).

Što se tiče bakra u tkivu creva, on je, za razliku od serumskog bakra, u ovom istraživanju bio statistički značajno snižen u ileumu i cekumu IBD pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom (u ostalim segmentima nije bilo statistički značajnih razlika). U ileumu su najniže vrednosti bile u KB, a u cekumu u UK podgrupi. Važan rezultat je i pozitivna korelacija vrednosti bakra u descendnom kolonu sa CRP. Rezultati Lih-Brody i njene grupe bili su slični našima, s obzirom da su i oni pronašli smanjenje bakra u sluznici creva obolelih od UK i KB (109). S druge strane, kada razmatramo studije u kojima je bakar određivan u nekom tkivu koje nije krv, Cho i Yang (2018) nisu pokazali razliku u nivou bakra u kosi dece među IBD podgrupama i kontrolama (49). Pozitivna korelacija između bakra u descendnom kolonu i CRP još jednom naglašava povezanost viših nivoa bakra sa zapaljenjem (121).

Kod osoba obolelih od IBD često se uočava deficit cinka, ovakav poremećaj posebno je karakterističan za KB (45, 125, 126). Rezultati našeg istraživanja ovoga puta nisu bili u skladu sa drugim studijama, s obzirom da deficit cinka u serumu nije bio prisutan ni u jednoj od grupa koje smo ispitivali, dok su druge studije pokazale ovaj deficit barem u KB (48, 117, 119). No ipak, naša studija jeste pokazala deficit cinka u terminalnom delu ileuma u IBD grupi u poređenju sa kontrolama. S druge strane, u kolonu nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji cinka među grupama. Griffine je sa svojom istraživačkom grupom pokazao da se Zn smanjeno resorbuje kod adolescenata obolelih od KB (127). Fiziološki Zn se apsorbuje u tankom crevu i to njegovom čitavom dužinom, te bi smanjenje apsorpcije koje je pokazano kod KB moglo da dovede do smanjenja koncentracije Zn u terminalnom ileumu kod IBD pacijenata koje je naša studija pokazala. Kada je koncentracija cinka u debelom crevu u pitanju Lih-Brody i kolege (1996) našli su da je ovaj element smanjen u mukozni obolelih od UK, dok je njegova redukcija bila prisutna samo u neupaljenom delu kolona kod KB u odnosu na kontrole. U drugoj studiji pokazano je sniženje cinka u delu kolona gde je postojala upala odnosu na neupaljeni deo kod UK pacijenata (108). Međutim, u ovim studijama drugi faktori su mogli uticati na koncentraciju cinka s obzirom na to da nisu uzimali uzorke u vreme postavljanja dijagnoze poput naše studije. Tako na primer, terapija, hirurške intervencije i slično, mogli bi biti odgovorni za razliku u koncentraciji cinka dobijenu između naše i drugih studija odnosno ovi faktori nisu mogli uticati na rezultate u našoj studiji. Osim toga, ove studije nisu kao naša rađene u dečijoj populaciji. Stoga, mi smatramo da cink u kolonu nije povezan sa patogenezom IBD u dečijem uzrastu.

Makroelementi u serumu nisu se značajno razlikovali među ispitivanim grupama u našoj studiji. Međutim, kada je tkivo creva u pitanju, magnezijum je bio jedini makroelement za koga je pokazana statistički značajna razlika. Ovaj metal bio je statistički značajno snižen u pojedinim delovima creva (ileum, cekum i sigmoidni kolon) osoba sa IBD. Song i njegova grupa (2014) pokazali su da je deficit Mg u serumu postojao kod 10% dece obolele od KB (45). S obzirom da magnezijum reguliše urođeni i stečeni imunitet, a da njegov deficit

potencira zapaljenje (128), smanjenje Mg u kolonu koje smo pokazali kod IBD pacijenata moglo bi biti značajno u patogenezi ove bolesti.

Hrom je jedan od elemenata koji se izdvojio u našoj studiji sa potencijalnim značajem za IBD patogenezu. Pokazali smo da je ovaj element u većoj koncentraciji (statistički značajno) prisutan kod obolelih od IBD i KB u odnosu na kontrole u transverzalnom delu debelog creva. Osim toga, koncentracija hroma u descendentnom kolonu obolelih od KB (ovaj segment, takođe, je sadržao više hroma u odnosu na kontrole, ali razlika nije bila statistički značajna), pozitivno je korelirala sa fekalnim kalprotektinom, a negativno (statistički visoko značajno) sa nivoom albumina. Cr (VI) bi mogao delovati toksično na epitel creva, povećavanjem oksidativnog stresa (putem Fentonove reakcije) što posledično dovodi do zapaljenja (129). Osim toga, Cr (VI) se povezuje sa gastrointestinalnim karcinomima (129). Naprotiv, trovalentni hrom je za organizam koristan element čiji su pozitivni efekti pokazani na modelima kolitisa (130). U zaključku, naša studija pokazuje da bi hrom mogao biti tkivni indikator razvoja IBD i crevnog zapaljenja. Bez obzira što naša studija sugerise negativnu ulogu Cr u IBD patogenezi, s obzirom na potpuno različito delovanja ovog elementa u različitim valentnim stanjima, potrebne su nove studije da bi se uloga Cr u ovoj bolesti dodatno pojasnila.

Metali kao što su cink, bakar, kadmijum i arsen vezuju se za metalotionein (MT). MT su proteini male molekulske težine bogati cisteinom. Ovi proteini imaju ulogu u detoksikaciji (Cd i As) i održavanju homeostaze esencijalnih elemenata (Zn i Cu) (131, 132). U našoj studiji svi pomenuti elementi bili su statistički značajno smanjeni u određenim delovima creva (Cd i As u kolonu i Zn i Cu u ileumu) dece sa IBD dijagnozom. Studije uglavnom pokazuju da pacijenti sa IBD imaju smanjenu ekspresiju MT u epitelu creva u poređenju sa kontrolama dok među KB i UK pacijentima ne postoje razlike u ekspresiji (132). Takođe, treba dodati da je kod IBD pacijenata ova ekspresija bila smanjena u upaljenom delu creva u odnosu na neupaljeno (108). U ćelijskoj kulturi Caco-2 ćelija, modelu koji se generalno smatra modelom crevnog epitela ljudi, akumulacija Cd korelirala je sa njihovom koncentracijom MT (133). Moguće da do ove akumulacije ne dolazi kada je ekspresija MT smanjena kao npr. u mukozni creva kod IBD. Ovo bi moglo objasniti niži nivo Cd u kolonu dece obolele od IBD koji smo pokazali, a isto objašnjenje bi moglo važiti i za druge metale koje se vezuju za MT (Zn, Cu, As), a za koje je naša studija pokazala snižene koncentracije kod IBD pacijenata u nekim delovima creva.

Premda su toksična dejstva arsena dobro poznata, jedna studija nedavno je pokazala njegove pozitivne efekte na zapaljenje u debelom crevu. U ovoj studiji se čak preporučuje da jedinjenje ovog elementa postane dodatak terapiji IBD (57). U ovoj studiji As₂O₃ smanjivao je oksidativni stres, prevenirao apoptozu i ćelijsko oštećenje, obnavljao sluznicu i poboljšavao kliničku sliku i makroskopski uočljivo oštećenje kada je dat dan pre ili na dan izazivanja kolitisa (57). S obzirom na pokazane pozitivne efekte As u crevnom zapaljenju, smanjen nivo As u kolonu dece sa UK koje je pokazan u našoj studiji, može ukazati na smanjenje ovog protektivnog efekta arsena.

Aluminijum je danas često korišćen u svakodnevnom životu npr. kao aditiv u hrani, zatim hrana se često pakuje u aluminijum, a i kuhinjsko posuđe se pravi od ovog metala. Postoje brojni dokazi o značaju aluminijuma za IBD patogenezu (134-136). Za ovaj metal je pokazano da remeti funkciju epitelne barijere i uzrokuje disbiozu. Osim toga, interesantno je da postoji mogućnost da može povećati patogenost nekih bakterija čime one postaju sklonije započinjanju granulomatoznog zapaljenja (137). Prema jednoj studiji na animalnom modelu aluminijum dat oralno pojačava zapaljenje u crevima (136), dok je studija na Caco-2 ćelijama i tkivnim biopsijama obolelih od KB pokazala da aluminijum povećava sekreciju citokina u

tkivu. Osim toga u Caco-2 ćelijama uzrokovao je zapaljenje i smanjenu ekspresiju transportera za eliminaciju ksenobiotika (134). Naša studija jeste pokazala razliku u koncentraciji aluminijuma među grupama, ali ne u smeru u kome smo to očekivali s obzirom na podatke iz literature o ulozi aluminijuma u IBD patogenezi. Naime, naši rezultati pokazali su sniženje aluminijuma u kolonu u grupi obolelih od UK i IBD. Kada smo poredili pojedinačne segmente, dobili smo slične rezultate, s obzirom da su svi delovi debelog creva imali manje aluminijuma u odnosu na kontrole. Razlika je bila statistički značajna u cekumu, ascendentnom i descendentnom delu debelog creva. Nadalje deca obolela od UK imala su statistički značajno manje Al u descendentnom delu kolona u poređenju sa kontrolama. Najlogičnije objašnjenje naših rezultata leži u slaboj bioraspodivnosti aluminijuma. Naime, 38% aluminijuma uzetog oralno se zadrži u crevnoj mukozii (137). S obzirom da je intestinalna barijera oštećena kod IBD moguće je da ovo utiče da se kod ovih pacijenata manje Al akumulira u crevima, a više transportuje kroz njih u odnosu na zdravu sluznicu, što onda čini ovaj element manje zastupljenim u IBD u odnosu na kontrolnu grupu.

Ova teza poredila je morfometrijske karakteristike ćelijskih jedara crevnih ćelija obolelih od KB, UK i kontrolne grupe. Osim toga, istraživanje je obuhvatilo međusobno poređenje morfoloških deskriptora jedra sedam različitih crevnih segmenata u okviru svake od tri ispitivane grupe. Površina jedra se pokazala kao značajan parametar za izdvajanje UK od drugih ispitivanih grupa, dok je ovaj parametar u kombinaciji sa solidnošću jedra bio odličan u razlikovanju UK i KB. Cirkularnost se izdvojila među drugim morfometrijskim varijablama, kao najbolja za dijagnostiku KB, s obzirom na to da je uočena statistički značajna razlika ovog parametra u odnosu na zdrave i obolele od UK. Rektum je bio najznačajniji segment za detekciju KB.

Pregledom literature pronašli smo studije koje su se u okviru IBD istraživanja takođe, bavile morfometrijskom analizom jedara obolelih. Jedna takva studija nije uspela da pokaže morfometrijske razlike između jedara obolelih od IBD (dijametar, površina i perimetar) i obolelih od nespecifičnog kolitisa, ali u istoj studiji ove karakteristike su uspešno razlikovale IBD od granuloma (138). Zatim istraživanje na biopsijama kolona pokazalo je da različiti morfometrijski parametri u kombinaciji mogu razlikovati sa visokom preciznošću (>91%) normalno crevo, nespecifični kolitis i UK, dok je preciznost razlikovanja KB bila nešto niža (56%). No ipak, u ovoj studiji gledana pojedinačno, morfometrija ćelijskih jedara nije dala statistički značajne razlike među ispitivanim grupama (68). Generalno gledano, za razliku od naše studije ove dve studije nisu pokazale veći značaj morfometrije jedara crevnih ćelija u IBD dijagnostici. Zatim, u jednom istraživanju morfometrijska analiza jedra (npr. veličina, varijacije veličine i oblik jedra) i ćelija creva primenjena je na obolele od UK koji su kao komplikaciju razvili displaziju creva niskog, visokog stepena ili karcinom creva. Ova studija pokazala je rast jedra i povećanje jedro/citoplazma odnosa počevši od regenerativnih promena (ove promene kod IBD često pokazuju preklapanja sa promenama viđenim kod prave displazije (139)), preko displazije niskog do displazije visokog stepena. Veličina jedra kod karcinoma bila je između veličine jedara displazije niskog i visokog stepena, dok je odnos jedro/citoplazma bio najveći kod tumora (140). I Hamilton i njegove kolege (1990) pokazali su značaj morfometrije jedara crevnih ćelija u kombinaciji sa morfometrijom tkiva creva u razlikovanju regenerativnih promena od displazije creva kod pacijenata obolelih od UK (141).

Nadalje, bilo je više morfometrijskih studija koje se nisu bavile ćelijskim jedrom već su se odnosile na druge elemente tkiva creva (142-148). Jedna takva (142) primenjena je na biopsije rektuma pacijenata obolelih od IBD za razlikovanje KB, UK i kontrola. Ova studija predlaže korišćenje morfometrijskih parametara - deformacije kripte, stromalne fibroze i broja eozinofila, kao pomoćnih sredstava za razlikovanje UK od KB (142). Druge studije iz istog

perioda (iz osamdesetih godina prošlog veka) pokazale su značaj morfometrije rektuma za razlikovanje UK od infektivne dijareje (145) i hronične zapaljenjske bolesti creva (144) ovog dela creva od kontrola. Nadalje, pokazane su promene u različitim morfometrijskim parametrima tkiva creva obolelih od UK u odgovoru na terapiju salicilatima ili prednizonom (npr. porast površine površinskog epitela, kriptnog epitela, porast odnosa broja peharastih ćelija prema epitelnim) (146). Zatim, u istraživanju koje se bavilo kvantifikovanjem zapaljenjskih ćelija, kolagena i arhitekture tkiva, morfometrijske karakteristike razlikovale su kliničke fenotipove (inflamatorni fenotip, fenotip sa dominacijom striktura i fenotip sa dominacijom fistula) i mogle su predvideti hirurški tretman kod obolelih od KB kolitisa (147). I na kraju, jedna skorašnja studija (149) pokazala je povezanost određenih imunoloških karakteristika sa morfometrijskim varijablama tkiva kolona obolelih od UK (npr. broj CD22+ limfocita sa širinom kripe i visinom površinskog epitela, IgM antitela sa gustinom ćelijskog infiltrata u kolonu, neutrofilima i bazofilima, IgA antitela sa makrofagima, limfocitima i bazofilima). Iako se metodologija umnogome razlikovala i nije se odnosila na ćelijska jedra, baš kao i naša, sve ove studije pokazuju značaj morfometrije u IBD istraživanju. Naposljetku, analiza rektuma (143), ileuma i jejunuma (148) pokazala je morfometrijske razlike između starih i mladih pacijenata.

Jedra terminalnog ileuma su se prema svim morfometrijskim deskriptorima značajno razlikovala u UK i KB grupi, dok je površina jedra bila jedini parametar koji u ovom segmentu nije uspeo da razlikuje jedra obolelih od KB od jedara pacijenata u kontrolnoj grupi. S obzirom da je kod obolelih od UK tanko crevo pošteđeno tj. da je ovo bolest debelog creva, ne čudi postojanje morfometrijskih razlika jedara tankog creva obolelih od KB (bolest koja zahvata i tanko crevo) u odnosu na ostale grupe. Nespecifično zapaljenje terminalnog dela ileuma u UK pacijenata sa zahvaćenošću čitavog debelog creva, *backwash ileitis*, (3) postojalo je i kod 33.3% naših pacijenata, no, s obzirom na ubedljive rezultate koje smo dobili, izgleda da nije otežalo morfometrijsko razlikovanje UK i KB u ovom delu creva. U istom smeru idu i rezultati koji pokazuju da su veličina jedra i koeficijent aspekta kod pacijenata sa UK bili značajni za razlikovanje terminalnog ileuma od kolona. Stoga, možemo zaključiti da pojedini morfometrijski deskriptori mogu dobro da razlikuju delove creva zahvaćene bolešću od nezahvaćenih delova.

Mada je bilo segmenata u kojima statistički značajna razlika nije nađena, površina jedara u kolonu bila je prilično dosledna u razlikovanju UK od KB i kontrole grupe pokazujući najveću veličinu jedra u UK grupi. Stoga, se ovaj deskriptor pokazao kao najznačajniji u grupi morfometrijskih deskriptora za prepoznavanje UK. Segmenti kolona gde nije pokazana statistički značajna razlika, rektum i transversalni kolon, u međusegmentnom poređenju statistički značajno su se razlikovali od većine ostalih segmenata kolona obolelih od UK. Regulacija veličine ćelijskog jedra mogla bi biti važna za njegovu funkciju, dok promene u volumenu jedra mogu da utiču na koncentraciju jedarnih proteina, RNK i DNK u njemu (150). Stoga bi veća jedra creva kod dece obolele od UK, mogla imati značaj i za patofiziologiju ove bolesti. Podatak koji nedostaje ovoj studiji je podatak o veličini same ćelije na osnovu koga bismo mogli da pokažemo da li je porast veličine jedra kod UK praćen porastom ćelije što bi onda mogao biti i uzrok povećanja jedra ili se pak veličina ćelije ne razlikuje u odnosu na kontrole, te bi potencijalno objašnjenje moglo biti u postojanju poremećaja transporta između jedra i citoplazme (150).

U transversalnom kolonu po veličini jedara se nisu izdvajali pacijenti sa UK, već oboleli od KB. Njihova jedra su bila veća od onih u kontrolnoj grupi što je dovelo do statistički značajne razlike. Prema indeksima histološke aktivnosti izgleda da je KB bila nešto aktivnija u ovom segmentu i da ga je ređe preskakala nego druge segmente. Stoga je moguće da razlike u aktivnosti bolesti mogu imati uticaja na veličinu jedra.

Dok je najvažniji morfometrijski parametar, kada je UK u pitanju, definitivno površina jedra, za KB je daleko značajnija bila njegova cirkularnost koja je u većini segmenata kolona imala moć da ove pacijente diferencira od kontrolnih subjekata, dok je u dva segmenta postojala razlika i u odnosu na UK. Oboleli od KB generalno su imali jedra manje kružnog oblika u odnosu na druge dve grupe.

Dok cirkularnost pokazuje koliko su ispitivana jedra slična savršenom krugu, koeficijent aspekta pokazuje odnos duže prema kraćoj osi ispitivanih jedara. Kako bi veće odstupanje duže od kraće ose delimično uticalo na manje kružan oblik jedra i time njegovu cirkularnost, ova dva parametra su donekle povezana. Međutim, treba naglasiti da je bilo mnogo više statistički značajnih razlika kada se posmatra cirkularnost, nego u koeficijentu aspekta te se ovaj parametar pokazao kao senzitivniji za IBD dijagnostiku.

Solidnost jedra se, baš kao i njegova površina, pokazala značajnom u razlikovanju KB od UK, takođe, pokazavši razliku u četiri od sedam ispitivanih segmenata. Posmatrano zajedno, ova dva parametra dala su statistički značajnu razliku između ovih bolesti u čak pet segmenata, te bi njihovo zajedničko korišćenje imalo potencijal za primenu upravo u dijagnostici u svrhu razlikovanja KB od UK. Ovo bi moglo značajno olakšati dijagnostiku, kada se uzme u obzir da je patohistološki lakše dijagnostikovati IBD nego napraviti razliku između njegova dva glavna fenotipa (10) i da u 10 do 20% IBD debelog creva ni kliničari ni patolozi ne mogu razlikovati UK od KB (58).

Rektum se pokazao kao najznačajniji segment za dijagnozu KB, s obzirom da su u ovom segmentu cirkularnost, koeficijent aspekta i solidnost jedra crevnih ćelija mogli razlikovati KB od UK i kontrola. Slično je pokazala i jedna davnašnja studija (142) u kojoj su morfometrijski pokazatelji razlikovali UK, KB i kontrole u populaciji odraslih bolje nego standardno korišćene histološke varijable ili subjektivan metod dijagnoze koji se tada koristio u svakodnevnoj praksi. Zbog manjkavosti koje su postojale u studiji, ona ipak ne preporučuje korišćene ovih rezultata u svakodnevnoj praksi za razlikovanje UK od KB, ali sugerše da bi se neki od morfometrijskih pokazatelja koji su se pokazali najbolje za razlikovanje KB i UK (deformacija kripti, stromalna fibroza i broj eozinofila) mogli koristiti kao pomoć pri dijagnostici (142). Ipak, za razliku od naše studije u ovoj studiji morfometrijska analiza nije primenjena na ćelijsko jedro već na različite elemente crevnog tkiva. Osim toga, kada je dečija populacija u pitanju, ova studija u multivarijantnoj analizi nije pokazala prednost morfometrije u odnosu na subjektivnu dijagnostičku procenu za razlikovanje KB od UK (142). U studiji Jenkinsa i saradnika (1988) morfometrija rektuma prilično je dobro (u 95% slučajeva sa definitivnom dijagnozom i 85% graničnih slučajeva) razlikovala hroničnu zapaljenjsku bolest creva od zdravog tkiva (144). S druge strane, Thompson i kolege (1985) koristeći biopsije rektuma nisu uspeli da primenom morfometrije na ovo tkivo razlikuju UK od KB iako su ovom tehnikom uspeli da razlikuju UK od infektivnih dijareja i zdravih (145). Premda između ovih studija i našeg istraživanja postoje razlike, kako u metodologiji (naša se studija bavila morfometrijskim karakteristikama ćelijskog jedra) tako i u rezultatima, sve studije ukazuju na značaj morfometrije rektuma u dijagnostici IBD. S obzirom da je ovaj segment relativno lako dostupan za uzimanje biopsije, postoji veliki potencijal za primenu ovih parametara na jedra rektuma u dijagnostici KB. Na ovaj način smanjila bi se invazivnost dijagnostike koja trenutno zahteva endoskopiju čitavog debelog creva i završnog dela tankog creva.

Korelacija regionalnih patohistoloških skorova za KB (GHAS) sa morfometrijskim parametrima dala je važne rezultate. Naime, kod dece obolele od KB, cirkularnost jedara enterocita leve polovine debelog creva (descendentni, sigmoidni kolon i rektum) pokazala je negativnu korelaciju sa regionalnim GHAS tih delova creva. Dakle, što su jedra u ovom delu creva bila sličnija pravilnom krugu, to je histološka aktivnost bila niža. Ove rezultate pojačava i činjenica da je u descendentnom kolonu postojala pozitivna korelacija između

koeficijenta aspekta i pomenutog indeksa, a u rektumu njegova negativna korelacija sa solidnošću jedra. Osim toga, indeks endoskopske aktivnosti KB SES-CD pokazao je značajne negativne korelacije sa solidnošću i cirkularnošću. U zaključku, osim mogućnosti korišćenja morfometrijskih parametara u dijagnostičke svrhe, ovi parametri (naročito cirkularnost) mogu se koristiti i za procenu endoskopske i histološke aktivnosti bolesti.

Kadmijum je u tkivu cekuma obolelih od UK pokazao negativnu korelaciju sa cirkularnošću i solidnošću i pozitivnu sa koeficijentom aspekta crevnih jedara. Ovaj rezultat u skladu je sa studijom koja pokazuje ultrastrukturne promene u jedrima bubrega pacova pod uticajem nanočestica kadmijum sulfida (151). Osim toga, pokazane su malformacije jedra eritrocita šarana pod uticajem jedinjenja kadmijuma (152).

Koncentracija hroma obolelih od KB u cekumu negativno je korelirala sa veličinom njihovih jedara, što je u skladu sa studijom koja je proučavajući efekat šesterovalentnog hroma na jedra tireoidnih ćelija pacova pokazala da se jedra pod uticajem ovog metala statistički značajno smanjuju. Ista studija pokazala je da izložena ovom elementu jedra pokazuju raznovrsne oblike poput okruglih i smanjenih ili izduženih, ovalnih i piknotičkih (153). U našoj studiji u rektumu obolelih od KB hrom je negativno korelirao sa koeficijentom aspekta.

S obzirom da je aluminijum metal koji se najviše povezuje sa patogeneom KB, interesantna je i negativna korelacija koncentracije aluminijuma u terminalnom ileumu sa cirkularnošću i površinom jedara ćelija u ovom delu creva.

Ova teza pokazala je da jedra kolona dece obolele od UK imaju statistički značajno veću strukturnu i teksturalnu kompleksnost, merenu kroz povišenu FD i smanjenu lakunarnost u odnosu na kontrole i decu obolelu od KB. Značajna razlika postojala je u većem delu debelog creva. Ovo je veoma važan rezultat, s obzirom na to da je nekada teško razlikovati KB i UK. Zapravo, pokazalo se da su patolozi bolji u dijagnostikovanju IBD nego u njegovom kategorisanju u podtipove (10). S druge strane, jedina statistički značajna razlika u FD i lakunarnosti teksture jedra između obolelih od KB i kontrola postojala je u rektumu, dok je lakunarnost transverzalnog kolona obolelih od KB bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrole.

Pregledom literature nismo pronašli ni jednu drugu studiju koja se u okviru istraživanja IBD bavila računanjem FD i lakunarnosti jedarnog hromatina crevnih ćelija. Fraktalna analiza, s druge strane, bila je više puta korišćena u ispitivanju drugih crevnih bolesti. Naime, pokazala se korisnom u dijagnostici (154, 155) i odgovoru na terapiju (156, 157) crevnih karcinoma. Metodologija koja se zasniva na fraktalnoj analizi pokazala se prilično tačnom u otkrivanju abnormalnosti analizom slika dobijenih putem VCE (158). Fraktalna analiza primenjivana je sa uspehom i na slike dobijene endoskopijom rektuma kada je uspevala da razlikuje zdravu od patološki izmenjene mikrovaskulature ovog dela creva, a bila je korisna i u razlikovanju različitih rektalnih patologija (npr. razlikovala je kolitis od vaskularnih malformacija) (159). Kada je u pitanju sam IBD, postoji nekoliko slučajeva primene fraktalne analize. Naime, ova tehnika korišćena je sa uspehom u jednoj studiji koja se bavila identifikovanjem ulcera, između ostalih i onih koji su posledica IBD, na slikama dobijenim pomoću VCE (69). Takođe, tehnika je korišćena pri detektovanju crevnih zvukova kod UK i drugih crevnih poremećaja (71). Fraktalna analiza primenjena je i na slike histoloških preparata obolelih od KB bojene *Masson's trichrome* bojom. U ovoj studiji FD ekstraćelijskog matriksa korelirala je sa histološkim skorovima za fibrozu. Nadalje, preparati sa različitim histološkim skorovima za fibrozu imali su statistički značajno različite FD, te bi se prema saznanjima koja donose ove studije moglo zaključiti da progresija fibroze kod KB ne predstavlja samo puko gomilanje ekstraćelijskog matriksa već uključuje i strukturne promene u njemu (70).

Rezultati poređenja fraktalne dimenzije, prema našem istraživanju, bili su prilično ujednačeni, no odstupanja su ipak bila prisutna u nekim segmentima. Jedan od primera je transverzalni deo debelog creva u kome nije bilo razlike između FD nuklearnog hromatina obolelih od KB i UK. Deca sa KB imala su najviše vrednosti FD upravo u ovom segmentu. S obzirom na to da ove bolesti ne moraju zahvatiti sve delove creva koje smo u ovoj studiji ispitivali i da nivo intenziteta bolesti može da varira u zahvaćenim crevnim delovima, izračunali smo regionalne skorove koji pokazuju histološku aktivnost bolesti svakog segmenta. Rezultati pokazuju da je KB kod naših pacijenata ređe preskakala transverzalni kolon u odnosu na druge delove creva (manje je bilo pacijenata sa GHAS indeksom ispod četiri koji označava remisiju). Nadalje, u ovom segmentu su pacijenti oboleli od KB češće imali umereno aktivnu bolest u odnosu na druge segmente (GHAS 8-10). Sve ovo ukazuje na nešto aktivniju bolest u ovom delu creva. Ovakav rezultat ukazuje da bi razlike u patohistološkoj aktivnosti bolesti mogle imati uticaja na rezultate FD. I pored toga, ovo ne čini fraktalnu analizu manje zanimljivom za buduću dijagnostičku primenu, s obzirom da se u rutinskoj patohistološkoj dijagnostici analizira svih sedam crevnih segmenata koje smo i mi koristili u studiji. Kada gledamo rezultate FD jedara iz svih sedam segmenata, jasno se vidi da se FD kod pacijenata sa UK statistički značajno razlikovala u odnosu na obolele od KB i kontrolnu grupu.

UK je bolest debelog creva, te su očekivano FD jedara u tankom crevu (terminalnom delu ileuma), bile značajno niže nego u ostatku kolona s izuzetkom rektuma. Dakle, FD se još jednom pokazala dobrom u razlikovanju tkiva zahvaćenih i nezahvaćenih ovom bolešću. Nadalje, fraktalna dimenzija jedara rektuma bila je viša od nuklearnih fraktalnih dimenzija drugih ispitivanih grupa, ali ova razlika nije bila dovoljno izražena, te statistička značajnost nije dobijena. Uz to, prema poređenju među segmentima UK pacijenata fraktalna dimenzija jedara rektuma značajno se razlikovala u odnosu na druge segmente sa izuzetkom transverzalnog kolona. Iako je rektum deo creva koji je zahvaćen kod ogromne većine obolelih od UK, u dečijem uzrastu pošteđa rektuma je moguća. Histološka pošteđa rektuma, bilo apsolutna (normalan rektum) ili relativna (manje izraženo zapaljenje u odnosu na druge delove creva), prisutna je u pedijatrijskoj populaciji obolelih sa učestalošću od 30% (160).

Analiza jedara rektuma je i kod dece obolele od KB dala zanimljive rezultate. Naime, ovo je bio jedini segment u kome su se fraktalne dimenzije teksture jedara pacijenata razlikovale statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu. FD su u ovom segmentu bile niže u odnosu na druge segmente ($p < 0.025$), sve osim sigmoidnog kolona. Stoga, FD rektuma ima potencijal za korišćenje u dijagnostici Kronove bolesti. Vrlo interesantno, morfometrijska analiza jedara koja je sprovedena u okviru ove teze, takođe, je izdvojila rektum kao najvažniji segment za dijagnostiku KB, budući da su se cirkularnost, koeficijent aspekta i solidnost statistički značajno razlikovali u obolelih od KB u odnosu na UK i kontrole. Na osnovu naših rezultata, čini se da kompjuterska analiza tekstura jedara rektuma ima veliki značaj za dijagnostiku KB.

Objašnjenje povećane FD jedara UK pacijenata u debelom crevu moglo bi biti postojanje povećanog odnosa euhromatina (takozvanog otvorenog hromatina) prema heterohromatinu. Otvoreni hromatin je manje gusto pakovan, te se manje intenzivno boji i izgleda svetlije. Studija koja je proučavala kako fizička struktura hromatina utiče na transkripciju gena (161) upućuje na povezanost povećane heterogenosti strukture hromatina što se ogleda višom fraktalnom dimenzijom sa povećanom varijabilnošću genske ekspresije u većini bioloških procesa. Nadalje, heterogenost hromatina u istraživanju tumora pokazala se kao znak njegove agresivnosti (75, 161-163). Međutim, i u gastrointestinalnim oboljenjima, pa i u samom IBD promene i u strukturi hromatina i vezivanju proteina su se pokazale značajnim za patogenezu bolesti (164). Na standardnim preparatima obojenim HE koji se koriste u dijagnostici nije lako prepoznati strukturne promene u hromatinu (162), dok se

otvoreni hromatin može pokazati fraktalnom analizom s obzirom da daje povećane vrednosti fraktalne dimenzije jedra (162, 165).

Rezultati ove teze pokazuju da pacijenti oboleli od UK imaju prevashodno povećanu eu/heterohromatin odnos u nukleusima enterocita u poređenju sa decom obolelom od KB i kontrolama. Jedan od epigenetskih mehanizama koji dovodi hromatin u otvorenije stanje, pogodnije za transkripciju je acetilacija histona. Na ovaj način, povećano odmotavanje tj. otvaranje DNK omogućava transkripciju (166). Suprotan proces, odnosno deacetilacija ovih proteina, omogućava vezivanje DNK i histona i time je pristup DNK ponovo ograničen (167). Neki od enzima uključenih u deacetilaciju histona pokazali su različitu ekspresiju u upaljenom debelom crevu obolelih od UK u odnosu na isto tkivo obolelih od KB. Naime, ovi enzimi, Sirtuin (SIRT)1, SIRT6 i histon deacetilaza (histone deacetylase - HDAC) 9, bili su niži u crevu obolelih od UK u odnosu na obolele od KB (168). Smanjena aktivnost histon deacetilaza kod UK pacijenata mogla bi voditi većoj količini euhromatina u jedru, s obzirom da ovi enzimi povećavaju količinu acetilovanih histona. Ovo bi moglo dovesti do značajno više FD kod ovih pacijenata u odnosu na obolele od KB. Zanimljivo je da inhibitori histon deacetilaze predstavljaju moguće nove lekove za terapiju UK. Ovi lekovi smanjuju upalu u ćelijama epitela debelog creva i u kolitisu izazvanom dekstran sulfat natrijumom (169).

Prema podacima iz ranijih istraživanja, povećanje lakunarnosti hromatina je često u kombinaciji sa smanjenjem njegove FD (75). Upravo ovakvi rezultati dobijeni su i u našoj studiji. U kolonu su postojale iste statistički značajne razlike u nuklearnoj FD i lakunarnosti. Štaviše, nuklearna lakunarnost se za izdvajanje KB od kontrole pokazala nešto boljom u odnosu na FD. Naime, ovaj parametar razlikovao je KB i kontrole u više segmenata nego FD.

Korelacija parametara fraktalne analize jedara crevnih ćelija sa koncentracijama oligoelemenata u tkivu creva pokazala je veći broj statistički značajnih korelacija u sve tri ispitivane grupe. Međutim, kako korelacije uključuju veliki broj poređenja, očekivano je da su neke statistički značajne korelacije posledica slučajnosti. Stoga, rezultate korelacija treba tumačiti sa velikim oprezom. Ovde će biti komentarisani samo oni rezultati koji su se ponavljali po ispitivanim crevnim segmentima i oni čija je statistička značajnost bila toliko visoka da je mala verovatnoća da su posledica slučajnosti. Jedna takva povezanost uočena je između koncentracije hroma u cekumu i fraktalne dimenzije jedara u tom segmentu kod obolelih od KB. Prema našim rezultatima, u ovom segmentu, veća koncentracija hroma značila je nižu FD kod obolelih od KB. Izuzetno visok Spirmanov koeficijent i visoka p vrednost istakli su ovu korelaciju ($rs=-0.952$, $p<0.0001$). Ono što je još čini zanimljivom je činjenica da smo prethodno pokazali da je ovaj element u većoj koncentraciji (statistički značajno) prisutan kod obolelih od IBD i KB u odnosu na kontrole u transverzalnom delu debelog creva. Osim toga, descendenti kolon obolelih od KB, koji je takođe sadržao više hroma u odnosu na kontrole (bez statističke značajnosti), pozitivno je korelirao sa fekalnim kalprotektinom, a negativno (statistički visoko značajno) sa nivoom albumina. Stoga nam ova korelacija još jednom ukazuje da treba obratiti pažnju na hrom u daljim istraživanjima patogeneze KB.

Kao što je prethodno objašnjeno, rezultati ove teze ukazali su na moguću ulogu Mn u razvoju KB i, takođe, nekoliko nedavno sprovedenih studija povezalo je IBD patogenezu sa manjkom mangana (115, 116). I rezultati korelacije oligoelemenata sa parametrima fraktalne analize jedra izdvojili su Mn kao značajan. Naime, ovaj element je u tankom crevu obolelih od KB (u ovom delu creva postojala statistički značajno niža vrednost mangana kod obolelih KB u odnosu na druge grupe) i ascendentnom delu debelog creva pokazao pozitivnu korelaciju sa FD i negativnu sa lakunarnošću ćelijskog jedra, što bi moglo značiti da se

genska ekspresija ovih jedara menja sa promenom koncentracije mangana (161) te ovo još jednom ukazuje na mogući značaj Mn u KB.

Ova teza poredila je i GLCM teksturalne karakteristike čelijskih jedara creva (kontrast, korelacija, *ASM* i homogenost) obolelih od KB, UK i kontrolne grupe. Nadalje, istraživanje je obuhvatilo međusobno poređenje GLCM teksturalnih karakteristika jedara sedam različitih crevnih segmenata u okviru svake od tri ispitivane grupe. Postojanje statistički značajnih razlika za svaki od parametara ispitivano je za 3 različite vrednosti udaljenosti među posmatranim pikselima ($d=1\text{px}$, 5px , 25px). Prema našim rezultatima, sve određivane GLCM teksturalne karakteristike jedara creva statistički značajno su se razlikovale između dece obolele od UK i dece koja su pripadala drugim ispitivanim grupama (KB i kontrolna grupa) u tankom crevu (terminalni ileum), a sa izuzetkom korelacije (iako je i u ovom parametru postojala značajna razlika između UK i kontrola za $d=25\text{px}$) i *ASM* za $d=25\text{px}$ (značajna razlika postojala je između UK i KB) i u sigmoidnom delu debelog creva. Slično, cekum i rektum su se, uz par izuzetaka, značajno razlikovali između obolelih od UK i kontrola u pogledu kontrasta i homogenosti (cekum i u *ASM*). Značajni za razlikovanje KB od kontrola ovoga puta bili su ascendentni kolon (statistički značajne razlike nisu postojale samo za kontrast za $d=1\text{px}$ i korelaciju) i rektum (izuzeci su kontrast za $d=25\text{px}$ i *ASM* za $d=1\text{px}$ i homogenost $d=25\text{px}$).

Sve je više istraživanja koja su sa uspehom upotrebila, između ostalih, i GLCM metod u dijagnostici IBD: ovakve studije primenjivale su ovu metodu na radiološke (72, 170, 171) i endoskopske (172) slike. Nadalje, GLCM analiza dala je dobre rezultate u istraživanju IBD i u studijama koje su je primenile na slike patohistoloških preparata (15, 73).

Naši rezultati jasno pokazuju da se prema svim ispitivanim GLCM teksturalnim parametrima jedra terminalnog ileuma obolelih od UK, razlikuju od jedara ovog dela creva obolelih od KB i jedara zdravog tankog creva kontrolne grupe. Naime, jedra obolelih od UK generalno su bila uniformnija (*ASM* je mera uniformnosti (173)), homogenija i sa manje kontrasta u odnosu na druge grupe, dok je korelacija među pikselima bila niža kod UK. S obzirom da UK ne zahvata tanko crevo, a ovaj deo creva jedan je od najčešće zahvaćenih KB (174), razliku između ove dve grupe lako je objasniti. Međutim, očekivali bismo da jedra terminalnog ileuma pacijenata obolelih od UK nisu mnogo različita od onih u zdravoj populaciji, ali naši rezultati ovo demantuju. Moguće objašnjenje je *backwash* ileitis, nespecifično zapaljenje terminalnog ileuma kod obolelih od UK sa zahvatanjem čitavog kolona. Ovaj nalaz bio je prisutan u 33.3% naših pacijenata i mogao bi imati uticaja na rezultate. Osim toga, moguće je i da u slučaju nepostojanja patohistološki detektabilnog *backwash* ileitisa, pacijenti sa UK u terminalnom ileumu imaju neke promene koje su posledica zapaljenja u debelom crevu. U zaključku, terminalni ileum je pogodan segment za dijagnostiku UK baziranu na GLCM teksturalnoj analizi.

U našoj studiji po pitanju histološke aktivnosti u obolelih od UK (prema regionalnim *Nancy* indeksima) izdvojili su se cekum, sigmoidni kolon i rektum. Histološka aktivnost u cekumu i sigmoidnom kolonu bila je identična i visoka. Naime, u 60 % slučajeva *Nancy* indeks je bio 3 ili 4, a ove segmente bolest je poštedela samo u 10% slučajeva. Slično je bilo i u rektumu (60% *Nancy* 3 ili 4), uz postojanje histološkog *rectal sparing* u 20% slučajeva. Moguće je da su ovakvom rasporedu aktivnosti bolesti doprinele specifičnosti UK u dečijem uzrastu - *rectal sparing* (poštedita rektuma) i *cecal patch* (diskontinuirano zahvatanje cekuma kod inače levostranog UK (175)). Upravo su GLCM karakteristike jedara ova tri segmenta bile značajne za dijagnostiku UK. U sigmoidnom kolonu homogenost, kontrast i *ASM* ($d=1$ i $d=5$) razlikovali su UK od drugih ispitivanih grupa, a u rektumu (osim *ASM*) i cekumu uz par izuzetaka od kontrola. U ovoj studiji nije dobijena značajna razlika u većini segmenata kolona između UK i kontrola ni u jednom ispitivanom GLCM parametru, ali izgleda da su se razlike pojavljivale baš u segmentima u kojima je histološka aktivnost bila jača, te

preporučujemo da se u budućim studijama koje se budu bavile kompjuterskom dijagnostikom UK zasnovanom na GLCM tekstualnoj analizi, istraživači fokusiraju upravo na ove segmente.

Rektum se još jednom pokazao kao dobar za dijagnostiku KB, s obzirom da su svi GLCM parametri (ne uvek i za svako d) uspevali da detektuju statistički značajnu razliku između obolelih od KB i kontrolne grupe. Osim toga, pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija GHAS skora histološke aktivnosti KB i GLCM parametra korelacije u rektumu, te bi se ovaj parametar mogao koristiti i za procenu aktivnosti bolesti. Ovaj za biopsiju lako dostupni segment se dobro pokazao u dijagnostici KB i u morfometrijskoj i fraktalnoj analizi jedara, te preporučujemo da se analiza jedara ovog segmenta zasnovana na ove tri analize u nekim budućim studijama iskoristi za razvoj kompjuterski potpomognute dijagnostike KB.

U kolonu su analize uglavnom pokazivale istovremeno razliku u *ASM* koji je mera uniformnosti, homogenosti i kontrastu, s tim da su *ASM* i homogenost išli u suprotnom smeru u odnosu na kontrast dok je razlika u korelaciji uglavnom izostajala. Uopšteno na mestima gde je postojala statistički značajna razlika parametara jedara creva između kontrolne i drugih grupa, jedra kontrola su bila manje uniformna i homogena i u njima je postojao veći kontrast. Dakle, u ovim slučajevima jedra u kontrolnoj grupi su bila heterogenija i posedovala su kompleksniju teksturu sa većim varijacijama u odnosu na obolele. Jedna studija (73) koja je sprovedena na animalnom modelu za istraživanje IBD (DSS kolitis) pokazala je da kolitis smanjuje kontrast, povećava *ASM* i homogenost, dok tretman kolitisa sulfasalazinom približava ove parametre njihovim vrednostima u kontrolnoj grupi. Dakle, i u ovoj kao i u našoj studiji, kontrast je bio veći, a homogenost i *ASM* niži kod kontrola u odnosu na kolitis. Treba napomenuti da je ova studija, za razliku od naše, primenjena na crevne kripte, a ne samo na jedra crevnih ćelija. Međutim, moguće je da promene ove tri GLCM karakteristike na nivou jedra, detektovane u našoj studiji utiču i na njihovu promenu u kriptama creva. Jedna studija sprovedena na UK pacijentima pedijatrijskog uzrasta izdvajala je na osnovu različitih (između ostalih i GLCM teksturalnih) karakteristika patohistoloških preparata mukoze creva dobijenih u trenutku dijagnoze pacijente koji će dobro odgovoriti na terapiju 5 aminosalicilnom kiselinom (5-ASA) i ući u jednogodišnju remisiju bez upotrebe kortikosteroida. Ova studija bazirana na mašinskom učenju kao najvažnije karakteristike koje su pomogle u klasifikovanju izdvojila je i GLCM kontrast i GLCM entropiju ($d=1,2,3,4,5$) i četiri ugla θ) (15). U našoj studiji se kontrast pokazao kao značajan u izdvajanju UK od kontrolne grupe dajući statistički značajne razlike u svim segmentima koji su se pokazali značajnim u IBD dijagnostici (terminalni ileum, cekum, ascendentni, sigmoidni kolon i rektum). Iako se pomenuta studija bavila prognozom pedijatrijskog UK, a naša ispitivanjem mogućnosti za upotrebu GLCM analize u dijagnostici IBD u dečijem uzrastu, obe studije pokazale su značaj GLCM analize, naročito GLCM kontrasta u IBD istraživanju.

Kod obolelih od UK u određenim delovima debelog creva (ascendentni i descendentni deo) pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija između regionalnog *Nancy* skora tog segmenta i kontrasta u jedru dok je korelacija *ASM* i homogenosti bila takođe statistički značajna, ali negativna. Dakle, veća histološka aktivnost bila je povezana sa većim kontrastom i manjom uniformnošću i homogenošću jedra. Stoga, kada je UK u pitanju, GLCM teksturalna analiza može imati ulogu ne samo u dijagnostici već i u proceni stepena aktivnosti bolesti.

Iz studija korelacija oligoelemenata i GLCM parametara izdvajaju se njihove korelacije sa kadmijumom. Kadmijum je u kontrolnoj grupi bio povezan sa većim kontrastom i manje homogenim jedrima, dok je kod obolelih od KB više kadmijuma značilo i manji kontrast u jedru. Iako su ove korelacije pokazane samo u određenim segmentima, naše istraživanje upućuje na različito reagovanje na kadmijum kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole.

U ovoj tezi sprovedena je imunohistohemijska ekspresija parametra oksidativnog stresa 4-HNE u tkivu. Creva u IBD-u su infiltrisana velikim brojem leukocita i drugih

imunskih ćelija koje proizvode reaktivne kiseonične vrste. Ove reaktivne kiseonične vrste u reakcijama sa fosfolipidima ćelijske membrane dovode do formiranja endogenih lipidnih peroksida kao što je 4-HNE (176). Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u obimu ekspresije (bez ekspresije, fokalna ili difuzna ekspresija) 4-HNE ni u epitelu, ni u zapaljenjskom infiltratu. Imunohistohemijski skor se takođe nije razlikovao između grupa. Naprotiv, veći broj studija pokazalo je povećanje lipidnih peroksida kako na eksperimentalnom modelu tako i kod pacijenata obolelih od IBD-a (176). Međutim, ova teza u skladu je sa studijom sprovedenom na pedijatrijskim pacijentima koja nije pokazala različit nivo oksidativnog stresa u odnosu na funkcionalna oboljenja creva (177). I ova studija, kao i naša, kao kontrolnu grupu koristila je pacijente sa funkcionalnim oboljenjima creva. Kod obolelih od iritabilnog kolona analizom seruma pokazan je viši nivo oksidativnog stresa i smanjen ukupni antioksidativni kapacitet (178). Nekoliko studija ukazalo je da oksidativni stres ima važnu ulogu u sindromu iritabilnog kolona, da može aktivno doprineti njegovom razvoju i hronicitetu (179). Ovo možda treba posmatrati u svetlu studija koje povezuju nivo oksidativnog stresa sa izloženošću stresu, a stres je dobro poznati faktor rizika za patofiziologiju iritabilnog kolona (179). U našem istraživanju u kontrolnoj grupi oko dve trećine pacijenata imalo je 4-HNE ekspresiju u epitelu, a polovina pacijenata u zapaljenjskom infiltratu. Ovakav nalaz mogao bi biti posledica toga što su kontrole bile oboleli od iritabilnog kolona. Iako je izbor kontrolne grupe možda umanjio razlike u oksidativnom stresu između kontrola i obolelih, formiranje kontrolne grupe koju bi činile potpuno zdrave osobe u pedijatrijskom uzrastu bilo bi veliki izazov. Nadalje, u našoj studiji u grupi obolelih od KB primećeno je da u zonama regeneracije nema ekspresije 4-HNE, što je takođe moglo doprineti izostanku značajne razlike između grupa. Studija koja je analizirala 4-HNE ekspresije u tkivu kolona kod obolelih od UK i u kontrolnoj grupi, pokazala je nizak intenzitet bojenja kod većine (79%) osoba u kontrolnoj grupi, 5% imalo je čak i srednji intenzitet bojenja dok je samo 16% bilo negativno. U istoj studiji, analiza nitroaktivnog stresa [3 nitrotirozina (3-nitrotyrosine - 3-NT)] pokazala je još intenzivniju ekspresiju u kontrolnoj grupi sa čak 37% pacijenata sa srednjim intenzitetom bojenja. Ova studija blagu pozitivnost creva kontrola na marker oksidativnog stresa objašnjava niskom koncentracijom reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta koja se povezuje sa normalnim signalnim procesima u zdravom tkivu. Ipak, u ovoj studiji vrednosti 3-NT i 4-HNE bile su više kod UK nego kod kontrola (u članku nije bilo podataka o statističkoj značajnosti ove razlike). Za razliku od ove studije koja je ispitivala intenzitet ekspresije, ova teza je ispitivala obim ekspresije. Osim toga, u ovoj studiji za razliku od naše koja je uključila novodijagnostikovane pacijente, pacijenti su bili osobe koje dugo godina pate od UK, a tkivo je dobijeno iz hirurški odstranjenog creva (180).

Prvenstvena uloga određivanja oksidativnog stresa u ovoj tezi bila je ispitivanje njegove povezanosti sa ostalim ispitivanim parametrima. Najvažnija takva povezanost ustanovljena je između svih parametara GLCM teksturalne analize jedara obolelih od KB i oksidativnog stresa. Naime, što je veći bio obim ekspresije 4-HNE kod ovih pacijenata to su kontrast i korelacija jedra bili niži, a homogenost i uniformnost (*ASM*) jedra viši. Na osnovu ovoga mogla bi se naslutiti uloga oksidativnog stresa u promenama u teksturi jedra obolelih od KB.

6.ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. - Ukupni holesterol je bio niži kod obolelih od UK i KB u odnosu na kontrolnu grupu, a HDL holesterol samo kod obolelih od KB.

- Parametar kreatin kinaza značajno se razlikovao među ispitivanim grupama sa najvišim vrednostima kod obolelih od UK, a najnižim kod obolelih od KB.

2.- Gvožđe u serumu bilo je značajno niže kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole, a Mn kod obolelih od KB u odnosu na obolele od UK, dok se bakar značajno razlikovao između ispitivanih grupa (KB, UK i kontrolna).

- U više segmenata creva Mg je bio niži u IBD nego u kontrolnoj grupi. U tankom crevu bakar, mangan i cink su bili značajno niži kod dece obolele od IBD u odnosu na kontrole, a Mn i kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole. Mn u serumu i descendntnom kolonu obolelih od KB negativno je korelirao sa PCDAI.

- Nivo gvožđa u grupama obolelih u pojedinim segmentima creva korelirao je sa zapaljenjskim parametrima, aktivnošću bolesti i obimom ekspresije 4-HNE u epitelnim ćelijama i imunohistohemijskim skorom.

3.- U završnom delu tankog creva jedra obolelih od KB razlikovala su se po morfometrijskim karakteristikama od jedara obolelih od UK i jedara u kontrolnoj grupi. Po veličini crevnih jedara moguće je izdvojiti obolele od UK od drugih ispitivanih grupa, a na osnovu njihove cirkularnosti obolele od KB od kontrole. Cirkularnost jedara enterocita leve polovine debelog creva (descendentni, sigmoidni kolon i rektum) obolelih od KB pokazala je negativnu korelaciju sa regionalnim GHAS skorovima. Rektum je bio odličan segment za morfometrijsku dijagnostiku KB.

- Deca obolela od UK su imala statistički značajno višu FD i nižu lakunarnost hromatina ćelijskih jedara debelog creva u odnosu na obolele od KB i kontrole. Mangan u tankom crevu i ascendentnom kolonu obolelih od KB je pozitivno korelirao sa FD i negativno sa lakunarnošću ćelijskog jedra.

- GLCM teksturalna analiza jedara završnog dela tankog creva pokazala je razliku između jedara obolelih od UK i jedara drugih ispitivanih grupa. Uz par izuzetaka isto je pokazano i u sigmoidnom kolonu. Rektum i ascendentni kolon bili su značajni segmenti za razlikovanje obolelih od KB od kontrolne grupe.

4. Obim ekspresije 4-HNE u epitelnim ćelijama creva obolelih od KB korelirao je sa GLCM teksturalnim parametrima jedara crevnih ćelija.

Na osnovu prikazanih rezultata ove studije može se reći da postoje razlike između dece obolele od UK, KB i kontrola u koncentraciji pojedinih, hematoloških i biohemijskih parametara, pojedinih oligoelemenata seruma i tkiva creva i u morfometrijskim, fraktalnim i GLCM teksturalnim karakteristikama jedara ćelija creva, kao i da se ove tri grupe ne razlikuju prema imunohistohemijskoj ekspresiji parametra oksidativnog stresa 4-HNE u

crevima. Pokazane promene u oligoelementima otvaraju put novim studijama koje bi dalje rasvetlile ulogu ovih elemenata u patogenezi IBD, dok pokazane razlike u morfološkim, fraktalnim i GLCM teksturalnim karakteristikama jedara otvaraju mogućnost za razvoj kompjuterski potpomognute dijagnostike ovih bolesti.

7. LITERATURA

1. Borowitz SM. The epidemiology of inflammatory bowel disease: Clues to pathogenesis? *Front Pediatr.* 2022;10:1103713.
2. Shapiro JM, Subedi S, LeLeiko NS. Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Rev.* 2016;37(8):337-47.
3. Conrad MA, Rosh JR. Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Clin North Am.* 2017;64(3):577-91.
4. Hanauer SB, Present DH, Rubin DT. Emerging issues in ulcerative colitis and ulcerative proctitis: individualizing treatment to maximize outcomes. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2009;5(6 Suppl):4-16.
5. Tavakoli P, Vollmer-Conna U, Hadzi-Pavlovic D, Grimm MC. A Review of Inflammatory Bowel Disease: A Model of Microbial, Immune and Neuropsychological Integration. *Public Health Rev.* 2021;42:1603990.
6. Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis(). *Dis Mon.* 2019;65(12):100851.
7. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017;389(10080):1741-55.
8. Li K, Friedman JR, Chan D, Pollack P, Yang F, Jacobstein D, et al. Effects of Ustekinumab on Histologic Disease Activity in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 2019;157(4):1019-31.e7.
9. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology.* 1998;114(2):262-7.
10. Feakins RM. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology.* 2014;64(3):317-35.
11. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):463-6.
12. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Jr., Colombel JF, Danese S, Rogers R, Bornstein JD, et al. Histologic Outcomes With Vedolizumab Versus Adalimumab in Ulcerative Colitis: Results From An Efficacy and Safety Study of Vedolizumab Intravenous Compared to Adalimumab Subcutaneous in Participants With Ulcerative Colitis (VARSITY). *Gastroenterology.* 2021;161(4):1156-67.e3.
13. Fuller MK. Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Special Considerations. *Surg Clin North Am.* 2019;99(6):1177-83.
14. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, et al. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(6):795-806.
15. Liu X. Interpretable Machine Learning for Histopathology Images Classification in Pediatric Ulcerative Colitis Remission Prediction: University of Cincinnati; 2022.
16. Akutko K, Iwańczak B. Evaluation of Fecal Calprotectin, Serum C-Reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, Seromuroid and Procalcitonin in the Diagnostics and Monitoring of Crohn's Disease in Children. *J Clin Med.* 2022;11(20).
17. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(4):205-17.
18. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(12):22529-42.
19. Lee M, Chang EB. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome- Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology.* 2021;160(2):524-37.

20. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):16-27.
21. Annese V. Genetics and epigenetics of IBD. *Pharmacol Res*. 2020;159:104892.
22. Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2020;578(7796):527-39.
23. Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(3):224-34.
24. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(1):3-10.
25. Lavoie S, Conway KL, Lassen KG, Jijon HB, Pan H, Chun E, et al. The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *eLife*. 2019;8:e39982.
26. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:551.
27. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*. 2019;2019:7247238.
28. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018;11(1):1-10.
29. Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(8):497-511.
30. Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(9):780-9.
31. Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:872725.
32. Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejón A, Borrueal N, Casellas F, et al. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(2):151-61.
33. Dolan KT, Chang EB. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1).
34. Rogler G, Vavricka S. Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(2):400-8.
35. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(27):6296-317.
36. Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesołowska E, Wierzbicka P, Wlazłowski M, et al. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep*. 2014;66(5):766-75.
37. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*. 2014;16(7):1024-33.
38. Reddavid R, Rotolo O, Caruso MG, Stasi E, Notarnicola M, Miraglia C, et al. The role of diet in the prevention and treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Acta Biomed*. 2018;89(9-s):60-75.
39. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018;64(2):20-57.
40. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91-9.
41. Okamoto R, Watanabe M. Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2016;51(1):11-21.

42. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):6-21.
43. Makevic V, Milovanovich ID, Popovac N, Janković S, Janković V, Stefanović S, et al. Oligoelements in serum and intestinal tissue of pediatric IBD patients. *J Trace Elem Med Biol*. 2023;79:127239.
44. Stochel-Gaudyn A, Fyderek K, Kościelniak P. Serum trace elements profile in the pediatric inflammatory bowel disease progress evaluation. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;55:121-6.
45. Song SM, Kim Y, Oh SH, Kim KM. Nutritional status and growth in Korean children with Crohn's disease: a single-center study. *Gut Liver*. 2014;8(5):500-7.
46. Wan Y, Zhang B. The Impact of Zinc and Zinc Homeostasis on the Intestinal Mucosal Barrier and Intestinal Diseases. *Biomolecules*. 2022;12(7).
47. Vaghari-Tabari M, Jafari-Gharabaghloou D, Sadeghsoltani F, Hassanpour P, Qujeq D, Rashtchizadeh N, et al. Zinc and Selenium in Inflammatory Bowel Disease: Trace Elements with Key Roles? *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(9):3190-204.
48. Sikora SK, Spady D, Prosser C, El-Matary W. Trace elements and vitamins at diagnosis in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Clin Pediatr (Phila)*. 2011;50(6):488-92.
49. Cho JM, Yang HR. Hair Mineral and Trace Element Contents as Reliable Markers of Nutritional Status Compared to Serum Levels of These Elements in Children Newly Diagnosed with Inflammatory Bowel Disease. *Biol Trace Elem Res*. 2018;185(1):20-9.
50. Mahadea D, Adamczewska E, Ratajczak AE, Rychter AM, Zawada A, Eder P, et al. Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Diseases-A Narrative Review. *Nutrients*. 2021;13(11).
51. Aksoyalp ZŞ, Temel A, Erdogan BR. Iron in infectious diseases friend or foe?: The role of gut microbiota. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2023;75:127093.
52. Fu Z, Xi S. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol Mech Methods*. 2020;30(3):167-76.
53. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Hultman P, Kono DH. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863(12):129299.
54. Chatterjee S, Sarkar S, Bhattacharya S. Toxic Metals and Autophagy. *Chemical Research in Toxicology*. 2014;27(11):1887-900.
55. Xia J, Jin C, Pan Z, Sun L, Fu Z, Jin Y. Chronic exposure to low concentrations of lead induces metabolic disorder and dysbiosis of the gut microbiota in mice. *Sci Total Environ*. 2018;631-632:439-48.
56. Liu W, Feng H, Zheng S, Xu S, Massey IY, Zhang C, et al. Pb Toxicity on Gut Physiology and Microbiota. *Front Physiol*. 2021;12:574913.
57. Moulahoum H, Boumaza BMA, Ferrat M, Bounaama A, Djerdjouri B. Arsenic trioxide ameliorates murine colon inflammation through inflammatory cell enzymatic modulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2019;392(2):259-70.
58. Farmer M, Petras RE, Hunt LE, Janosky JE, Galandiuk S. The importance of diagnostic accuracy in colonic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(11):3184-8.
59. Syrowatka A, Krömker D, Meguerditchian AN, Tamblyn R. Features of Computer-Based Decision Aids: Systematic Review, Thematic Synthesis, and Meta-Analyses. *J Med Internet Res*. 2016;18(1):e20.
60. Ma Z, Swiderska-Chadaj Z, Ing N, Salemi H, McGovern D, Knudsen B, et al., editors. *Semantic Segmentation of Colon Glands in Inflammatory Bowel Disease Biopsies. Information Technology in Biomedicine; 2019 2019//; Cham: Springer International Publishing.*

61. Vraneš VV. Optimization of computational analysis of morphology of malignant epithelial nests of breast tumors in order to improve disease prognosis: University of Belgrade; 2022.
62. Pantic I, Harhaji-Trajkovic L, Pantovic A, Milosevic NT, Trajkovic V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. *J Theor Biol.* 2012;303:87-92.
63. Voss RF. Characterization and Measurement of Random Fractals. *Physica Scripta.* 1986;T13:27-32.
64. Smith TG, Jr., Lange GD, Marks WB. Fractal methods and results in cellular morphology--dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods.* 1996;69(2):123-36.
65. Pathan S, Prabhu KG, Siddalingaswamy PC. A methodological approach to classify typical and atypical pigment network patterns for melanoma diagnosis. *Biomedical Signal Processing and Control.* 2018;44:25-37.
66. Shirvaikar M, Huang N, Dong XN. The Measurement of Bone Quality Using Gray Level Co-Occurrence Matrix Textural Features. *Journal of Medical Imaging and Health Informatics.* 2016;6(6):1357-62.
67. Dinčić M, Todorović J, Nešović Ostojić J, Kovačević S, Dunderović D, Lopičić S, et al. The Fractal and GLCM Textural Parameters of Chromatin May Be Potential Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis Specimens. *Microsc Microanal.* 2020;26(4):717-30.
68. Ficsor L, Varga VS, Tagscherer A, Tulassay Z, Molnar B. Automated classification of inflammation in colon histological sections based on digital microscopy and advanced image analysis. *Cytometry A.* 2008;73(3):230-7.
69. Charisis VS, Hadjileontiadis LJ, Liatsos CN, Mavrogiannis CC, Sergiadiis GD. Capsule endoscopy image analysis using texture information from various colour models. *Comput Methods Programs Biomed.* 2012;107(1):61-74.
70. Weber MC, Schmidt K, Buck A, Kasajima A, Becker S, Wilhelm D, et al. P067 Fractal analysis of extracellular matrix as a new histological method for observer-independent quantification of intestinal fibrosis in Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis.* 2023;17(Supplement_1):i234-i.
71. Hadjileontiadis LJ, Rekanos IT. Detection of explosive lung and bowel sounds by means of fractal dimension. *IEEE Signal Processing Letters.* 2003;10(10):311-4.
72. Mitrea D, Mitrea P, Badea R, Socaciu M, Ciobanu L, Adela G, et al. Computerized methods for the assessment and characterization of the inflammatory bowel diseases and colon cancer from ultrasound and endoscopic images. 2011.
73. Shan D, Zheng J, Klimowicz A, Panzenbeck M, Liu Z, Feng D. Deep learning for discovering pathological continuum of crypts and evaluating therapeutic effects: An implication for in vivo preclinical study. *PLoS One.* 2021;16(6):e0252429.
74. Singh TR, Roy S, Singh OI, Sinam T, Singh KM. A New Local Adaptive Thresholding Technique in Binarization. *ArXiv.* 2012;abs/1201.5227.
75. Metze K, Adam R, Florindo JB. The fractal dimension of chromatin - a potential molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019;19(4):299-312.
76. Haralick RMaS, K. and Dinstein, Its'Hak. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics.* 1973;SMC-3(6):610-21.
77. Dinčić M, Popović TB, Kojadinović M, Trbovich AM, Ilić A. Morphological, fractal, and textural features for the blood cell classification: the case of acute myeloid leukemia. *Eur Biophys J.* 2021;50(8):1111-27.

78. Glapa-Nowak A, Szczepanik M, Banaszkiwicz A, Kwiecień J, Szaflarska-Popławska A, Grzybowska-Chlebowczyk U, et al. C-Reactive Protein/Albumin Ratio at Diagnosis of Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Retrospective Multi-Center Study. *Med Sci Monit.* 2022;28:e937842.
79. Jin H-Y, Lim J-S, Lee Y, Choi Y, Oh S-H, Kim K-M, et al. Growth, puberty, and bone health in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *BMC Pediatrics.* 2021;21(1):35.
80. Kanof ME, Lake AM, Bayless TM. Decreased height velocity in children and adolescents before the diagnosis of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1988;95(6):1523-7.
81. Rinawi F, Assa A, Almagor T, Ziv-Baran T, Shamir R. Prevalence and Predictors of Growth Impairment and Short Stature in Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Digestion.* 2020;101(6):674-82.
82. Wine E, Reif SS, Leshinsky-Silver E, Weiss B, Shaoul RR, Shamir R, et al. Pediatric Crohn's disease and growth retardation: the role of genotype, phenotype, and disease severity. *Pediatrics.* 2004;114(5):1281-6.
83. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr.* 2015;169(11):1053-60.
84. Gerasimidis K, McGrogan P, Edwards CA. The aetiology and impact of malnutrition in paediatric inflammatory bowel disease. *J Hum Nutr Diet.* 2011;24(4):313-26.
85. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child.* 2003;88(11):995-1000.
86. Goyal A, Zheng Y, Albenberg LG, Stoner NL, Hart L, Alkhouri R, et al. Anemia in Children With Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper by the IBD Committee of the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2020;71(4):563-82.
87. Alves RA, Miszputen SJ, Figueiredo MS. Anemia in inflammatory bowel disease: prevalence, differential diagnosis and association with clinical and laboratory variables. *Sao Paulo Med J.* 2014;132(3):140-6.
88. Laffolie Jd, Laass MW, Scholz D, Zimmer K-P, Buderus S, Group C-GS. Prevalence of Anemia in Pediatric IBD Patients and Impact on Disease Severity: Results of the Pediatric IBD-Registry CEDATA-GPGE®. *Gastroenterology Research and Practice.* 2017;2017:8424628.
89. Yan SL, Russell J, Harris NR, Senchenkova EY, Yildirim A, Granger DN. Platelet abnormalities during colonic inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(6):1245-53.
90. Giannotta M, Tapete G, Emmi G, Silvestri E, Milla M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link? *Thrombosis Journal.* 2015;13(1):14.
91. Peter MI, Simon de L, Daniel T, Monica N, Kevin B. Risk of common infections in people with inflammatory bowel disease in primary care: a population-based cohort study. *BMJ Open Gastroenterology.* 2021;8(1):e000573.
92. De Hertogh G, Geboes K. Crohn's disease and infections: a complex relationship. *MedGenMed.* 2004;6(3):14.
93. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-Reactive Protein as a Marker for Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2004;10(5):661-5.
94. Daniluk U, Daniluk J, Krasnodebska M, Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. The combination of fecal calprotectin with ESR, CRP and albumin discriminates more accurately children with Crohn's disease. *Adv Med Sci.* 2019;64(1):9-14.
95. Powell-Tuck J. Protein metabolism in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1986;27(Suppl 1):67-71.
96. Khan N, Patel D, Shah Y, Trivedi C, Yang YX. Albumin as a prognostic marker for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(45):8008-16.

97. Bouazzi M, Bak NF, Agnholt J, Wewer V, Malham M, Bendix M. Paediatric Crohn's Disease Patients Have Increased Inflammatory Markers Compared to Adult Patients prior to Biological Treatment. *GastroHep*. 2022;2022:9550908.
98. Agouridis AP, Elisaf M, Milionis HJ. An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2011;24(3):181-7.
99. Sappati Biyyani RS, Putka BS, Mullen KD. Dyslipidemia and lipoprotein profiles in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Lipidol*. 2010;4(6):478-82.
100. Ripollés Piquer B, Nazih H, Bourreille A, Segain JP, Huvelin JM, Galmiche JP, et al. Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. *Metabolism*. 2006;55(7):980-8.
101. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, et al. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(3):807-15.
102. Aozaki S. Decreased membrane fluidity in erythrocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterol Jpn*. 1989;24(3):246-54.
103. Kitzenberg D, Colgan SP, Glover LE. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):31.
104. Al-Issa Y, Al-timimi M, Alkhalidi N. Determination Total Creatine Kinase Activity and Creatine Kinase Isoenzymes Activities in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease under Infliximab Therapy. 2022;15:1633-8.
105. Hall C, Lanis J, Dowdell A, Murphy E, Colgan S. CREATINE KINASE EXPRESSION IS PROTECTIVE IN A MOUSE COLITIS MODEL. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2023;29(Supplement_1):S46-S7.
106. Perez-Calle JL, Marin-Jimenez I, Lopez-Serrano P, Gisbert JP, Pena AS, Fernandez-Rodriguez C. Prevalence of macrocreatinkinase type 1 in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(2):486-9.
107. Hoffmann KM, Grillitsch M, Deutschmann A, Högenauer C, Stojakovic T, Hauer AC. Serum macromolecular creatine kinase type 1 as a diagnostic clue in inflammatory bowel disease? *Eur J Pediatr*. 2013;172(5):699-701.
108. Sturniolo GC, Mestriner C, Lecis PE, D'Odorico A, Venturi C, Irato P, et al. Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33(6):644-9.
109. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41(10):2078-86.
110. Carrier JC, Aghdassi E, Jeejeebhoy K, Allard JP. Exacerbation of dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: role of NF-kappaB. *Int J Colorectal Dis*. 2006;21(4):381-7.
111. Fang S, Zhuo Z, Yu X, Wang H, Feng J. Oral administration of liquid iron preparation containing excess iron induces intestine and liver injury, impairs intestinal barrier function and alters the gut microbiota in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018;47:12-20.
112. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(1):1-37.
113. Fitsanakis VA, Zhang N, Garcia S, Aschner M. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res*. 2010;18(2):124-31.

114. Smith EA, Newland P, Bestwick KG, Ahmed N. Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia. *J Trace Elem Med Biol.* 2013;27(1):65-9.
115. Choi EK, Aring L, Das NK, Solanki S, Inohara N, Iwase S, et al. Impact of dietary manganese on experimental colitis in mice. *Faseb j.* 2020;34(2):2929-43.
116. Nakata T, Creasey EA, Kadoki M, Lin H, Selig MK, Yao J, et al. A missense variant in SLC39A8 confers risk for Crohn's disease by disrupting manganese homeostasis and intestinal barrier integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2020;117(46):28930-8.
117. Ojuawo A, Keith L. The serum concentrations of zinc, copper and selenium in children with inflammatory bowel disease. *Cent Afr J Med.* 2002;48(9-10):116-9.
118. Ringstad J, Kildebo S, Thomassen Y. Serum selenium, copper, and zinc concentrations in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28(7):605-8.
119. Mohammadi E, Qujeq D, Taheri H, Hajian-Tilaki K. Evaluation of Serum Trace Element Levels and Superoxide Dismutase Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Translating Basic Research into Clinical Application. *Biol Trace Elem Res.* 2017;177(2):235-40.
120. Ma Y, Zhang X, Fan D, Xia Q, Wang M, Pan F. Common trace metals in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;56:81-9.
121. Malavolta M, Piacenza F, Basso A, Giacconi R, Costarelli L, Mocchegiani E. Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mech Ageing Dev.* 2015;151:93-100.
122. Urbanowicz T, Hanć A, Ołasińska-Wiśniewska A, Rodzki M, Witkowska A, Michalak M, et al. Serum copper concentration reflect inflammatory activation in the complex coronary artery disease - A pilot study. *J Trace Elem Med Biol.* 2022;74:127064.
123. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews.* 2010;68(3):133-47.
124. Freeland-Graves JH, Sanjeevi N, Lee JJ. Global perspectives on trace element requirements. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:135-41.
125. Ehrlich S, Mark AG, Rinawi F, Shamir R, Assa A. Micronutrient Deficiencies in Children With Inflammatory Bowel Diseases. *Nutr Clin Pract.* 2020;35(2):315-22.
126. Weisshof R, Chermesh I. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(6):576-81.
127. Griffin IJ, Kim SC, Hicks PD, Liang LK, Abrams SA. Zinc metabolism in adolescents with Crohn's disease. *Pediatr Res.* 2004;56(2):235-9.
128. Maier JA, Castiglioni S, Locatelli L, Zocchi M, Mazur A. Magnesium and inflammation: Advances and perspectives. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2021;115:37-44.
129. Hu G, Long C, Hu L, Zhang Y, Hong S, Zhang Q, et al. Blood chromium exposure, immune inflammation and genetic damage: Exploring associations and mediation effects in chromate exposed population. *Journal of Hazardous Materials.* 2022;425:127769.
130. Odukanmi OA, Salami A, Koda K, Morakinyo O, Olaleye S. Trivalent Chromium Promotes Healing of Experimental Colitis in Mice by Suppression of Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of Biosciences and Medicines.* 2017;05:108-26.
131. Rahman MT, De Ley M. Arsenic Induction of Metallothionein and Metallothionein Induction Against Arsenic Cytotoxicity. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2017;240:151-68.
132. Socha-Banasiak A, Sputa-Grzegorzółka P, Grzegorzółka J, Pacześ K, Dziegiel P, Sordyl B, et al. Metallothioneins in Inflammatory Bowel Diseases: Importance in Pathogenesis and

- Potential Therapy Target. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2021;2021:6665697.
133. Blais A, Lecoœur S, Milhaud G, Tomé D, Kolf-Clauw M. Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;160(1):76-85.
 134. Djouina M, Waxin C, Leprêtre F, Tardivel M, Tillement O, Vasseur F, et al. Gene/environment interaction in the susceptibility of Crohn's disease patients to aluminum. *Science of The Total Environment*. 2022;850:158017.
 135. Lerner A. Aluminum as an adjuvant in Crohn's disease induction. *Lupus*. 2012;21(2):231-8.
 136. Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*. 2014;7(3):589-601.
 137. Vignal C, Desreumaux P, Body-Malapel M. Gut: An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie*. 2016;100(329):75-84.
 138. Chakraborty K, Sarkar S, Manna AK, Sengupta S, Bag M. Study of Cellular Morphometry in Colorectal Epithelial Lesions with Clinicopathological Correlation. 2019.
 139. Villanacci V, Reggiani-Bonetti L, Salviato T, Leoncini G, Cadei M, Albarello L, et al. Histopathology of IBD Colitis. A practical approach from the pathologists of the Italian Group for the study of the gastrointestinal tract (GIPAD). *Pathologica*. 2021;113(1):39-53.
 140. Allen DC, Hamilton PW, Watt PC, Biggart JD. Morphometrical analysis in ulcerative colitis with dysplasia and carcinoma. *Histopathology*. 1987;11(9):913-26.
 141. Hamilton PW, Allen DC, Watt PC. A combination of cytological and architectural morphometry in assessing regenerative hyperplasia and dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology*. 1990;17(1):59-68.
 142. Schmitz-Moormann P, Himmelmann GW. Does quantitative histology of rectal biopsy improve the differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis in adults? *Pathol Res Pract*. 1988;183(4):481-8.
 143. Milosević PD, Trbojević J, Milicević NM, Bojić D, Davidović M, Svorcan P, et al. A quantitative morphometric study of rectal mucosa in adult and aged healthy subjects. *Histol Histopathol*. 2007;22(4):433-6.
 144. Jenkins D, Goodall A, Drew K, Scott BB. What is colitis? Statistical approach to distinguishing clinically important inflammatory change in rectal biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1988;41(1):72-9.
 145. Thompson EM, Price AB, Altman DG, Sowter C, Slavin G. Quantitation in inflammatory bowel disease using computerised interactive image analysis. *J Clin Pathol*. 1985;38(6):631-8.
 146. Zaitoun AM, Cobden I, al Mardini H, Record CO. Morphometric studies in rectal biopsy specimens from patients with ulcerative colitis: effect of oral 5 amino salicylic acid and rectal prednisolone treatment. *Gut*. 1991;32(2):183-7.
 147. Klein A, Mazor Y, Karban A, Ben-Itzhak O, Chowers Y, Sabo E. Early histological findings may predict the clinical phenotype in Crohn's colitis. *United European Gastroenterology Journal*. 2017;5(5):694-701.
 148. Trbojević-Stanković JB, Milićević NM, Milosević DP, Despotović N, Davidović M, Erceg P, et al. Morphometric study of healthy jejunal and ileal mucosa in adult and aged subjects. *Histol Histopathol*. 2010;25(2):153-8.
 149. Stoikevych MV, Gaydar YA, Tatarchuk OM, Milostiva DF, Tarasova TS, Petishko OP. Connection of immunological markers with morphological manifestations in ulcerative colitis. *GASTROENTEROLOGY*. 2023;57:101-7.

150. Walters AD, Bommakanti A, Cohen-Fix O. Shaping the nucleus: factors and forces. *J Cell Biochem.* 2012;113(9):2813-21.
151. Rana K, Verma Y, Rani V, Rana SVS. Renal toxicity of nanoparticles of cadmium sulphide in rat. *Chemosphere.* 2018;193:142-50.
152. Witeska M, Kondera E, Zdunek K. The Effects of Cadmium on Morphology of Common Carp Erythrocytes. *Polish Journal of Environmental Studies.* 2011;20.
153. Mahmood T, Qureshi IZ, Iqbal MJ. Histopathological and biochemical changes in rat thyroid following acute exposure to hexavalent chromium. *Histol Histopathol.* 2010;25(11):1355-70.
154. Goh V, Sanghera B, Wellsted DM, Sundin J, Halligan S. Assessment of the spatial pattern of colorectal tumour perfusion estimated at perfusion CT using two-dimensional fractal analysis. *Eur Radiol.* 2009;19(6):1358-65.
155. Streba L, ForȚofoiu MC, Popa C, Ciobanu D, Gruia CL, Mogoantă S, et al. A pilot study on the role of fractal analysis in the microscopic evaluation of colorectal cancers. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(1):191-6.
156. Dzik-Jurasz A, Walker-Samuel S, Leach M, Brown G, Padhani A, George M, et al. Fractal parameters derived from analysis of DCE-MRI data correlates with response to therapy in rectal carcinoma. 2004.
157. Tochigi T, Kamran SC, Parakh A, Noda Y, Ganeshan B, Blaszkowsky LS, et al. Response prediction of neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer using CT-based fractal dimension analysis. *Eur Radiol.* 2022;32(4):2426-36.
158. Jain S, Seal A, Ojha A, Krejcar O, Bureš J, Tachecí I, et al. Detection of abnormality in wireless capsule endoscopy images using fractal features. *Comput Biol Med.* 2020;127:104094.
159. Gryglewski A, Henry BM, Mrozek M, Żelawski M, Piech K, Tomaszewski KA. Sensitivity and Specificity of Fractal Analysis to Distinguish Between Healthy and Pathologic Rectal Mucosa Microvasculature Seen During Colonoscopy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2016;26(5):358-63.
160. Glickman JN, Bousvaros A, Farraye FA, Zholudev A, Friedman S, Wang HH, et al. Pediatric Patients With Untreated Ulcerative Colitis May Present Initially With Unusual Morphologic Findings. *The American Journal of Surgical Pathology.* 2004;28(2).
161. Almassalha LM, Tiwari A, Ruhoff PT, Stypula-Cyrus Y, Cherkezyan L, Matsuda H, et al. The Global Relationship between Chromatin Physical Topology, Fractal Structure, and Gene Expression. *Sci Rep.* 2017;7:41061.
162. Mattos AC, Florindo JB, Adam RL, Lorand-Metze I, Metzke K. The Fractal Dimension Suggests Two Chromatin Configurations in Small Cell Neuroendocrine Lung Cancer and Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor for Overall Survival. *Microsc Microanal.* 2022:1-5.
163. Karri S, Aviel-Ronen S, Firer MA. Fractal and textural imaging identify new subgroups of patients with colorectal cancer based on biophysical properties of the cancer cells. *Pathology - Research and Practice.* 2022;238:154040.
164. Ansari I, Raddatz G, Gutekunst J, Ridnik M, Cohen D, Abu-Remaileh M, et al. The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):610-9.
165. Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *Embo j.* 2009;28(24):3785-98.
166. Mobley AS. Chapter 4 - Induced Pluripotent Stem Cells. In: Mobley AS, editor. *Neural Stem Cells and Adult Neurogenesis: Academic Press; 2019. p. 67-94.*

167. Chessum N, Jones K, Pasqua E, Tucker M. Recent advances in cancer therapeutics. *Prog Med Chem.* 2015;54:1-63.
168. de Bruyn J, Wichers C, Radstake T, Broen J, D'Haens G. Histone deacetylases in inflammatory mucosa distinguish Crohn's disease from ulcerative colitis. *Journal of Crohn's & Colitis.* 2015;9(Suppl. 1):S87-S8.
169. Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today.* 2005;10(3):197-204.
170. Chen Y, Li H, Feng J, Suo S, Feng Q, Shen J. A Novel Radiomics Nomogram for the Prediction of Secondary Loss of Response to Infliximab in Crohn's Disease. *J Inflamm Res.* 2021;14:2731-40.
171. Li H, Mo Y, Huang C, Ren Q, Xia X, Nan X, et al. An MSCT-based radiomics nomogram combined with clinical factors can identify Crohn's disease and ulcerative colitis. *Ann Transl Med.* 2021;9(7):572.
172. Yao H, Stidham RW, Soroushmehr R, Gryak J, Najarian K, editors. Automated Detection of Non-Informative Frames for Colonoscopy Through a Combination of Deep Learning and Feature Extraction. 2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC); 2019 23-27 July 2019.
173. Davidovic LM, Cumic J, Dugalic S, Vicentic S, Sevarac Z, Petroianu G, et al. Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis for the Detection of Discrete, Ethanol-Induced, Structural Changes in Cell Nuclei: An Artificial Intelligence Approach. *Microsc Microanal.* 2022;28(1):265-71.
174. Ray G, Longworth MS. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(2):235-47.
175. Nevin D, Genta R, Saboorian HM. The Cecal Patch Is Associated with a Greater Prevalence of Symptoms in Patients with Ulcerative Colitis: 1618. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG.* 2012;107:S654.
176. Wang Y, Wang W, Yang H, Shao D, Zhao X, Zhang G. Intraperitoneal injection of 4-hydroxynonenal (4-HNE), a lipid peroxidation product, exacerbates colonic inflammation through activation of Toll-like receptor 4 signaling. *Free Radic Biol Med.* 2019;131:237-42.
177. Grzybowska-Chlebowczyk U, Wysocka-Wojakiewicz P, Jasielska M, Cukrowska B, Więcek S, Książewska M, et al. Oxidative and Antioxidative Stress Status in Children with Inflammatory Bowel Disease as a Result of a Chronic Inflammatory Process. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:4120973.
178. Choghakhori R, Abbasnezhad A, Hasanvand A, Amani R. Inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in irritable bowel syndrome: Association with digestive symptoms and quality of life. *Cytokine.* 2017;93:34-43.
179. Balmus I-M, Cojocariu R-O, Ciobica A, Strungaru S, Strungaru-Jijie R, Cantemir A, et al. Preliminary Study on the Tears Oxidative Stress Status and Sleep Disturbances in Irritable Bowel Syndrome Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2020;2020:4690713.
180. DE Angelis PM, Dorg L, Pham S, Andersen SN. DNA Repair Protein Expression and Oxidative/Nitrosative Stress in Ulcerative Colitis and Sporadic Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2021;41(7):3261-70.

Publikovani radovi iz teze:

Makevic V, Milovanovich ID, Popovac N, Janković S, Janković V, Stefanović S, Bukumiric Z, de Luka SR. Oligoelements in serum and intestinal tissue of pediatric IBD patients. *J Trace Elem Med Biol.* 2023 Sep;79:127239. doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127239 (M22, IF 3.5)

Makević V, Milovanovich ID, Popovac N, Janković R, Trajković J, Vuković A, Milosević B, Jevtić J, de Luka SR, Ilić AŽ. Fractal Parameters as Independent Biomarkers in the Early Diagnosis of Pediatric Onset Inflammatory Bowel Disease. *Fractal and Fractional.* 2023; 7(8):619. doi: 10.3390/fractalfract7080619 (M21a, IF 5.4)

Makević V, de Luka SR, Ilić AŽ. Essential trace metals in health and disease. *Medicinski podmladak.* 2023; 74(5):1-8. doi: 10.5937/mp74-43573

BIOGRAFIJA AUTORA

Vedrana Makević, rođena 07.07.1988. godine u Beogradu, Srbija, upisala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2007. godine. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,78. Doktorske akademske studije, modul Fiziološke nauke upisala je 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od septembra 2014. godine zaposlena je na Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, najpre kao saradnik u nastavi, a od jula 2016. godine kao asistent. Od maja 2022. angažovana je na projektu Fonda za nauku Republike Srbije u okviru projekta programa IDEJE „Ispitivanje polifenola u terapiji Fragilnog X sindroma na modelu Drozofile melanogaster“, a od aprila 2023. angažovana je i na ERASMUS+ projektu „Development and implementation of metacognitive problem-based modules in blended learning courses in medical sciences, ProBLEMS“.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ведрана Макевић

Број индекса ФН 10/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биохемијске карактеристике, имунохистохемијска испитивања и дигитална анализа слика патохистолошких препарата узорака црева деце са запаљенским болестима црева“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19.01.2024.

Ведран Макевић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ведрана Макевић

Број индекса ФН 10/13

Студијски програм Физиолошке науке

Наслов рада

„Биохемијске карактеристике, имунохистохемијска испитивања и дигитална анализа слика патохистолошких препарата узорака црева деце са запаљенским болестима црева“

Ментор I Проф.др Силвио де Лука

Ментор II др Анђелија Илић, ВНС

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 19.01.2024.

Ведрана Макевић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биохемијске карактеристике, имунохистохемијска испитивања и дигитална анализа слика патохистолошких препарата узорака црева деце са запаљенским болестима црева“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 19.01.2024.

Уедрачу Марковић