

Analiza rezultata fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kod pacijenata s i bez upalne bolesti crijeva

Rukavina, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:520489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ana Rukavina

**Analiza rezultata fekalne elastaze i fekalnog
kalprotektina kod pacijenata s i bez upalne
bolesti crijeva**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju „Imunokemija“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i suvoditeljstvom dr. sc. Lovorke Đerek, spec. medicinske biokemije.

Zahvaljujem se svojim mentoricama, dr. sc. Lovorki Đerek i doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na stručnom vodstvu, pruženoj podršci, pristupačnosti, te prenesenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Puno hvala Indiri Imširović, mag. med. biochem. na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i dečku, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, neizmjernej motivaciji i razumijevanju u svakom potrebitom trenutku. Hvala na svemu što ste mi pružili u ostvarenju svog cilja!

Veliko hvala prijateljima i kolegama, što ste dijelili sa mnom radost i tugu, uspone i padove, lijepo i teške trenutke. Hvala što ste mi uljepšali cijelo studiranje!

Ovaj diplomski rad posvećujem dragoj osobi, koja više nije tu, a bila bi najponosnija na moj uspjeh. Bez nje ništa od ovoga ne bi bilo moguće!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1. Ulcerozni kolitis.....	1
1.1.2. Crohnova bolest	2
1.1.3. Patofiziologija upalnih bolesti crijeva	4
1.1.4. Laboratorijska dijagnostika.....	7
1.1.5. Serološki biljezi	8
1.1.6. Insuficijencija pankreasa kod upalnih bolesti crijeva	9
1.2. Fekalna elastaza	11
1.3. Kalprotektin	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Uzorci.....	17
3.1.1 Ekstrakcija uzorka stolice	18
3.1.2. Laboratorijski postupak	19
3.2. Imunoturbidimetrija	19
3.3. Fekalna elastaza	20
3.3.1. Načelo postupka određivanja fELA.....	20
3.3.3. Potrebna oprema i reagensi.....	20
3.3.4. Referentni intervali	21
3.3.5. Verifikacija	22
3.4. Fekalni kalprotektin	23
3.4.1 Načelo postupka određivanja fKAL	23
3.4.2. Potrebna oprema i reagensi.....	23
3.4.3. Referentni intervali	24
3.5. Statistička obrada podataka.....	25
4. REZULTATI.....	26
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	36
8. LITERATURA	38
9. SAŽETAK	44

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD) su kronične idiopatske upalne bolesti gastrointestinalnog (GI) sustava karakterizirane ponavljajućim i prekomjernim imunskim odgovorom na crijevnu mikrofloru. Postoje dva glavna tipa bolesti, ulcerozni kolitis (UK) i Crohnova bolest (CB). Međusobno se razlikuju na način da zahvaćaju različite dijelove gastrointestinalnog trakta i prodiru na različitu dubinu unutar crijevnog zida. Iako se kod većine pacijenata poremećaji razlikuju, u otprilike 10 % slučajeva IBD-a upalne promjene crijeva su toliko slične da se ne mogu diferencirati, pa se stoga klasificiraju kao nedeterminirani kolitisi. Bolest je kroničnog tijeka, obilježena brojnim rekurentnim upalama dijelova probavnog sustava odnosno fazama remisije i relapsa, kao i mnogim ekstraintestinalnim komplikacijama. Dokazano je da pacijenti s IBD imaju povećan rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma (McDowell i sur., 2023; Salamunić i sur., 2017).

1.1.1. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis je kronična bolest karakterizirana difuznom upalom sluznice crijeva koja je ograničena na kolon ili rektum. Upala dovodi do kontinuiranih površinskih promjena sluznice (mukoze) i submukoze (Alghoul i sur., 2022). Kontinuirane promjene odnose se na ravnomjernu pogođenost sluznice određenog dijela debelog crijeva, u odnosu na Crohnovu bolest gdje su preskočena neka područja (<https://hucuk.hr/>). Ulcerozni kolitis prvi je opisao Samuel Wilks 1859. godine. Pojavnost bolesti se povećava u razvijenim zemljama zapadne Europe i Sjeverne Amerike te je usko povezana sa stilom života i okolišem. Početak bolesti je zabilježen u dobi između 15. i 35. godine. Budući da je prevalencija bolesti veća u mlađoj dobi i remeti pola života osobe, vjerojatno će postati globalni zdravstveni problem u bliskoj budućnosti (Seyedian i sur., 2019; Lynch i Hsu, 2023).

U 90 % slučajeva se manifestira u obliku krvavog proljeva sa ili bez sluzi. Pacijenti obično opisuju tenezme, nagon za pražnjenjem crijeva usprkos njegovoj ispražnjenosti, što se javlja zajedno s abdominalnom boli. Ovisno o proširenosti i težini bolesti, mogu se pojaviti simptomi kao što su umor, vrućica, malaksalost, vrtoglavica, gubitak elektrolita i težine. Često dolazi do

nastanka ekstraintestinalnih komplikacija u vidu kožnih i očnih manifestacija, artropatija, osteoporoza ili hepatobilijarna bolest (Segal i sur., 2021). Navedeni simptomi nisu specifični za upalne bolesti crijeva, stoga klinička dijagnostika mora uključivati kombinaciju endoskopskih, radioloških, kliničkih, histoloških i laboratorijskih testova. Upotreba jedne tehnike većinom nije dovoljna za postavljanje dijagnoze (Alghoul i sur., 2022).

Izgleđ sluznice crijeva razlikuje se ovisno o ozbiljnosti bolesti, u rasponu od minimalnih promjena do ulceracije, erozije te displazije stanica. Zahvaćena sluznica najčešće je crvena i granulirana, osjetljiva zbog čega spontano ili nakon kontakta dolazi do krvarenja. U težem obliku bolesti sluznica je opsežno zahvaćena, postaje blijeda, hemoragična, sklona nastanku edema, s različito eksprimiranim ulceracijama i površinskim erozijama stijenke crijeva (Marušić i sur., 2017). Upala se može proširiti dublje i zahvatiti mišićni sloj, što će otežati motoriku crijeva, pokreti crijeva će biti slabiji te može doći do nastanka toksičnog megakolona. Ukoliko upala zahvati vanjski vezivni sloj debelog crijeva, može uzrokovati njegovo pucanje i smrt (<https://hucuk.hr/>). Postoje glavna histopatološka obilježja bolesti koja mogu uputiti na dijagnozu UK. Dolazi do poremećaja u konstrukciji crijevnog epitela što se očituje skraćivanjem i smanjenjem razgranatosti kripti. Oštećenje epitela kripti uzrokuje infiltraciju imunskih stanica u njezin lumen. Neutrofilni napadaju epitel što rezultira kriptitisom, te na kraju apscesom kripti. U fazama izmjene remisije i relapsa, dolazi do atrofije odnosno skraćivanja debelog crijeva uslijed uništavanja kripti. Ovakve promjene ne moraju biti nužno vidljive u ranim stadijima bolesti, no ne isključuju dijagnozu UK (Kaur i Goggolidou, 2020; <https://www.hopkinsmedicine.org>). Kod nekih pacijenata značajan je nastanak pseudopolipa, ne-neoplastičnih lezija koje nastaju nakon ponavljajućih epizoda upala i ulceracija, povezane s prekomjernim procesima cijeljenja. Ukazuju na srednji rizik raka debelog crijeva i potreban je intenzivan nadzor takvih pacijenata (Politis i sur., 2017).

1.1.2. Crohnova bolest

Crohnova bolest je kronična upalni poremećaj nepoznate etiologije koja može zahvatiti sve dijelove gastrointestinalnog trakta, pri čemu je najčešće lokaliziran na području distalnog ileuma i kolona. Upala je u većini slučajeva segmentirana, asimetrična i transmuralna (zahvaća sve slojeve stijenke crijeva). Bolest se obično javlja između 20. i 40. godine života s nešto rjeđom pojavnosti oko 50. do 60. godine (Torres i sur., 2017). Prvi put je opisana 1932. godine od strane doktora

Burrill B. Crohna i njegovih suradnika (Feuerstein i Cheifetz, 2017). Klinička slika ovisi o lokalizaciji bolesti, intenzitetu upale te o prisutnosti specifičnih intestinalnih i ekstraintestinalnih komplikacija (Marušić i sur. 2017). Otprilike 50 % pacijenata razvije ekstraintestinalne manifestacije na koži (pyoderma gangrenosum i erythema nodosum), zglobovima (poliartikularni artritis) ili očima (episkleritis i uveitis) koji mogu prethoditi dijagnozi i ovisiti o aktivnosti CB (Cushing i Higgins, 2021).

Pacijenti s Crohnovom bolešću često imaju simptome nekoliko godina prije nego li se postavi točna dijagnoza. Glavni simptomi uključuju umor, groznicu, bol u trbuhu, mučninu, umor, dijareju i gubitak težine. Rektalno krvarenje je rjeđe, ali može se pojaviti ukoliko je zahvaćen distalni dio debelog crijeva. Simptomi mogu varirati tijekom vremena i često se pogrešno dijagnosticiraju kao sindrom iritabilnog kolona (eng. *irritable bowel syndrome*, IBS) (Cushing i Higgins, 2021). Važno je isključiti neinfektivna stanja (Bechetova bolest, ulcerozni kolitis, enteropatija uzrokovana primjenom nesteroidnih protuupalnih lijekova) kao i bakterijske i virusne infekcije koje oponašaju CB (Torres i sur., 2017).

Nakon postavljanja dijagnoze Crohnove bolesti, potrebno je odrediti fenotip bolesti prema Montrealskoj klasifikaciji koja se smatra internacionalnim standardom fenotipske klasifikacije Crohnove bolesti. Uključuje tri osnovna kriterija: dob u trenutku definiranja dijagnoze (A), lokalizaciju (L) te predominantni fenotip (B). Prema fenotipskoj predominantnoj prezentaciji (B), CB je klasificirana na nestrikurirajući / nepenetrirajući, strikturirajući i penetrirajući oblik (Katičić, 2013). Pravilna klasifikacija korisna je zato što predviđa tijek bolesti i nastanak komplikacija, potrebu za operacijom te omogućuje liječnicima odabir najbolje moguće terapije. U korelaciji je s genskom osjetljivošću, prisutnošću seroloških biljega te potrebom za imunosupresivima (Chow i sur., 2008; Baumgart i Sandborn, 2012).

U trenutku postavljanja dijagnoze većina pacijenata s CB-om ima izraženu upalnu patologiju. Praćena je proljevom i boli zbog akutne djelomične opstrukcije crijeva. Zatim tijekom vremena dolazi do progresije bolesti, a to se očituje komplikacijama kao što su strikture (suženja) i fistule (novonastali prolaz između crijeva i bilo kojeg susjednog organa). Kao posljedica perzistentnog upalnog procesa nastaju transmuralne lezije stijenke crijeva. Prekomjerni fibrogeni odgovor, uzrokovan infiltracijom fibroblasta, i aktivacija glatkih mišićnih stanica rezultiraju nastankom transmuralne fibroze i progresivnim zadebljanjem stijenke crijeva. Posljedično dolazi do suženja lumena crijeva, odnosno nastanak striktura (Ljubičić i sur., 2013; Feuerstein i Cheifetz,

2017). Striktore obično zahtijevaju kiruršku intervenciju. Skoro 20 % pacijenata s CB-om podvrgnuto je operaciji unutar 10 godina od postavljanja dijagnoze (Mohan i Coffey, 2020; Feuerstein i Cheifetz, 2017).

Dijagnoza se obično postavlja endoskopskim, radiološkim te histopatološkim pretragama. Bolest se tretira farmakološkom terapijom koja je određena ovisno o težini i fenotipu poremećaja. Glavni cilj je farmakološkom terapijom održati upalu pod kontrolom i potaknuti stanje remisije, ali većinom su pacijenti podvrgnuti operaciji. Nažalost, operacijom se ne postiže izlječenje, pri čemu će pacijenti i dalje biti primorani nastaviti terapiju u slučaju recidiva bolesti (Feuerstein i Cheifetz, 2017).

1.1.3. Patofiziologija upalnih bolesti crijeva

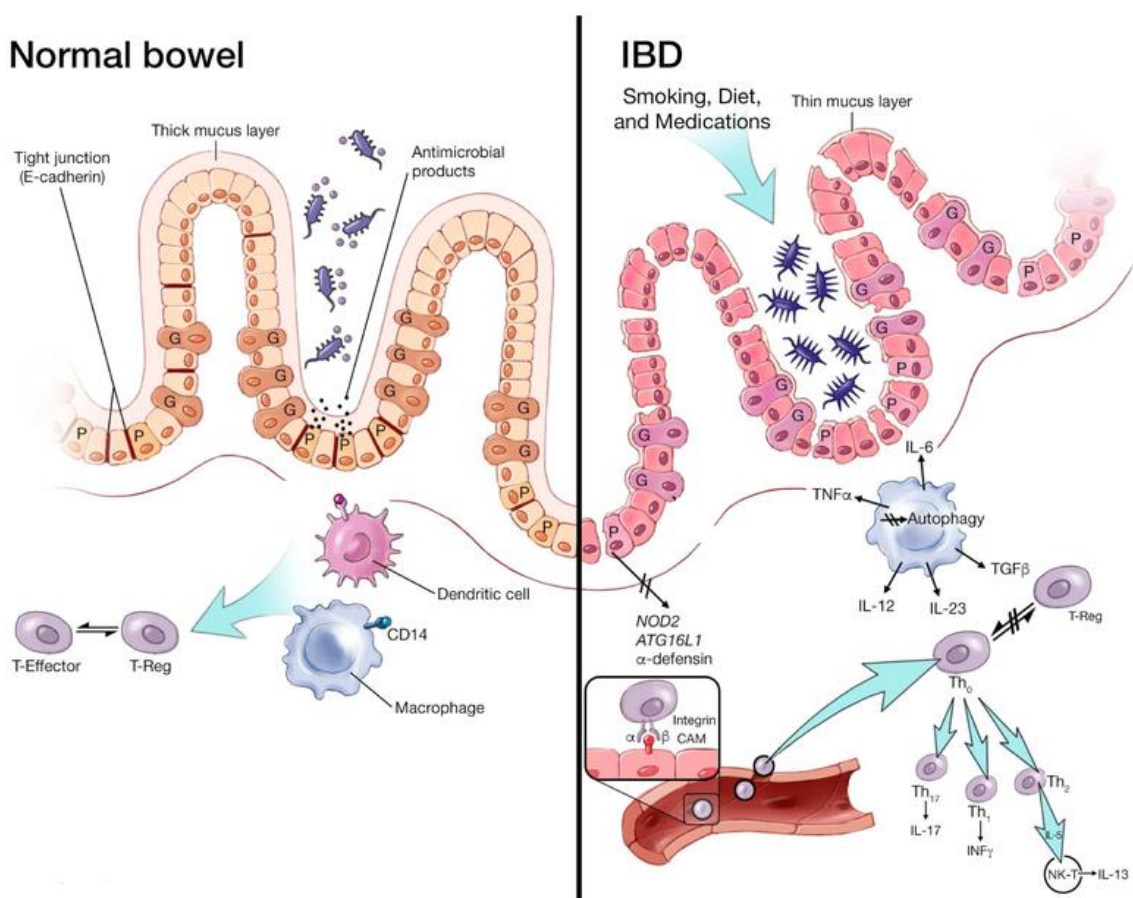
Iako je etiologija upalnih bolesti crijeva uglavnom nepoznata, uključuje složenu interakciju između genetskih i okolišnih čimbenika, utjecaj crijevne mikrobiote i prekomjerni odgovor imunskog sustava (Zhang i Li, 2014). Cjelogenomska asocijacijska studija (eng. *genome-wide association study*, GWAS) identificirala je približno 240 genskih lokusa povezanih s IBD (Alghoul i sur., 2022). Prvi otkriveni gen povezan s nastankom IBD-a je NOD2 (eng. *nucleotide-binding oligomerization domain 2*), koji je često mutiran kod pacijenata s Crohnovom bolešću. NOD2 gen kodira unutarstanični protein koji pripada porodici NLR (eng. *NOD-like receptor*). Prepoznaje muramil dipeptid (MDP), konzervirani motiv peptidoglikana prisutan na staničnoj stijenci Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Nakon vezanja liganda, dolazi do konformacijske promjene NOD2 koja će potaknuti aktivaciju unutarstaničnih signalizacijskih puteva te izazvati izlučivanje proupalnih citokina, poput IL-12. Dokazana je esencijalna uloga autofagocitoze u imunskom odgovoru IBD-a, a posebnu važnost imaju geni ATG16L1 (eng. *autophagy related 16 like 1 gene*) i IRGM (eng. *immunity-related GTPase family M protein*). Polimorfizam gena ATG16L1 dovodi do neusklađene autofagocitoze i povećava rizik od nastanka CB. Otkriveno je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) u genu IL-23R koji su visoko povezani s UK i CB. Navedeni gen kodira podjedinicu receptora specifičnog za proupalni citokin, interleukin IL-23, peptid ključan za diferencijaciju i proliferaciju Th17 (eng. *T helper cells*) stanica. Th17 stanice sudjeluju u povećanom stvaranju proupalnih citokina (IL-17,

IL-21, IL-22). Ovaj put je trenutačno meta komercijalno dostupnih lijekova za liječenje IBD (Guan, 2019; Ramos i Papadakis, 2019; Zhang i Li, 2014).

Upalne bolesti crijeva karakterizirane su trajnim imunskim odgovorom na izmijenjenu ili patogenu crijevu mikrofloru. Vjerojatno veću ulogu u nastanku i napredovanju bolesti ima promjena u sastavu i bioraznolikosti crijevne mikrobiote (disbioza), nego prisutnost određenih patogena. Kod pacijenata s IBD-om dolazi do smanjenja broja bakterija s protuupalnim kapacitetom i povećanja broja bakterija s upalnim kapacitetom u usporedbi sa zdravim osobama. U zdravom crijevu dominiraju rodovi *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Najčešće promjene uključuju smanjenje bakterija roda *Firmicutes* uz istovremeno širenje *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*). Adhezivna i invazivna *Escherichia coli* pronađena je u osoba s CB-om, za koje je tipična invazija u epitelne stanice, što utječe na permeabilnost crijeva, i replikacija unutar makrofaga. Promjene crijevnog mikrobioma dovode do izmjene metaboličkih puteva mikrobiote i koncentracije metabolita, poput žučne kiseline, kratkolančanih masnih kiselina i metabolita triptofana, koji sudjeluju u patogenezi IBD-a (Čipčić Paljetak i sur., 2022; Ramos i Papadakis, 2019; Zhang i Li, 2014).

Nadalje, disfunkcija urođenog i stečenog imunskog sustava može izazvati pretjerani odgovor imunskih stanica na normalnu crijevu mikrofloru. Inicijacija imunskog odgovora na crijevu floru strogo je regulirana, a ta regulacija određuje uspostavu tolerancije ili obrambenog upalnog odgovora. Poremećaj ravnoteže ovih odgovora može uzrokovati IBD. Navedenom pogoduje oštećenje epitelne barijere te povećana intestinalna permeabilnost koje su opažene kod osoba s IBD. Prva fizička barijera na koju nailaze crijevne bakterije i antigeni hrane na površini sluznice je mukozni sloj koji prekriva jednostruki sloj crijevnih epitelnih stanica. Crijevni epitel djeluje kao selektivna barijera koja ograničava ulaz antigena u imunološki sustav sluznice. Sastoji se od enterocita i specijaliziranih epitelnih stanica, kao što su vrčaste i Panethove stanice koje mogu lučiti defenzine s intrinzičnom antimikrobnom aktivnošću. Promjene u funkciji epitelne barijere omogućuju translokaciju luminalnih antigena (primjerice bakterijski antigeni koji potječu od komezalnih mikroorganizama) kroz crijevu sluznicu. Nakon susreta s antigenom, dendritičke stanice te druge antigen prezentirajuće stanice (eng. *antigen-presenting cells*, APC) pokreću kaskadu proupalnih i protuupalnih signala kako bi omogućili migraciju različitih podskupina lokalnih i cirkulirajućih limfocita na mjesto upale. Poremećena ravnoteža između proupalnih i protuupalnih signala rezultira pretjeranim odgovorom T-stanica. Transmuralna upala pacijenata s

CB rezultat je aktivacije Th1 i Th17 stanica koje oslobađaju mnogobrojne citokine kao što su interferon γ (IFN- γ), čimbenik nekroze tumora alfa (TNF α , eng. *tumor necrosis factor alpha*) te interleukini (IL-6 i IL-17). Ujednačena upala sluznice kod pacijenata s UK povezana je s Th2 i Th17 odgovorom uz povećano izlučivanje IL-5, IL-6, IL-13 i IL-17. Nekontrolirana upalna reakcija dovodi do kontinuiranog propadanja epitela i daljnjeg izlaganja crijevnim mikrobima, pri čemu se dodatno pogoršava upala. Narušenosti antimikrobne obrane pogoduju narušenost međustaničnih spojeva, neispravnost bakterijskog prepoznavanja i ekspresije antimikrobnih peptida (Guan, 2019; Ramos i Papadakis, 2019; Zhang i Li, 2014; Wehkamp i sur., 2016).



Slika 1: Prikaz intestinalne sluznice kod zdravog crijeva i IBD-a (preuzeto i prilagođeno iz Ramos i Papadakis, (2019) uz dopuštenje izdavača)

Novi epidemiološki trendovi pokazali su važnu ulogu okolišnih čimbenika u patogenezi IBD-a, posebno u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Pušenje je jedan od najproučavanijih čimbenika koji potiče IBD. Klinički je dokazano da pušenje cigareta povećava rizik za nastanak

CB, a s druge strane ima protektivan učinak za nastanak UK. Nikotin, esencijalni sadržaj cigareta, ima inhibitorni učinak na funkciju Th2 stanica, ali nema utjecaja na funkciju Th1 stanica. Uporaba antibiotika u ranoj dobi života uzrokuje promjene u crijevnom mikrobiomu i na taj način povećava rizik od IBD. Nesteroidni protuupalni lijekovi mogu inicirati IBD ili uzrokovati reaktivaciju bolesti i potaknuti gastrointestinalne komplikacije. Zabilježeno je da izloženost prehrani bogatoj zasićenim masnim kiselinama i mesnim prerađevinama povećava rizik od IBD-a (Guan, 2019; Klein i Eliakim, 2010; Ramos i Papadakis, 2019).

1.1.4. Laboratorijska dijagnostika

Sve veći broj laboratorijskih testova, u kombinaciji s endoskopskim ili slikovnim tehnikama, koristi se za praćenje aktivnosti bolesti ili postavljanje dijagnoze slučajeva pri sumnji na IBD. Prednost laboratorijskih pretraga leži u činjenici da ovi testovi moraju biti standardizirani kako bi osigurali usporedive rezultate parametara u različitim pretragama, brzi i isplativi.

Početne laboratorijske pretrage obuhvaćaju kompletnu krvnu sliku, upalne parametre te testove bubrežne i jetrene funkcije. Hematološim pretragama utvrđena je anemija, leukocitoza i trombocitoza (Wehkamp i sur., 2016). Pacijenti s IBD obično imaju anemiju uzrokovanu nedostatkom željeza (sideropenična anemija) koja nastaje kao posljedica kroničnog gubitka krvi i smanjene apsorpcije željeza uslijed upale sluznice crijeva. Važno je postaviti dijagnozu anemije i vrstu manjka željeza (funkcionalni ili apsolutni) na temelju kompletne krvne slike i laboratorijskih parametara prisutnosti željeza u organizmu (serumsko željezo, feritin, zasićenost transferina) (Kaitha i sur., 2015). Povišene aktivnosti alkalne fosfataze, gama-glutamil transferaze (GGT) i aminotransferaza usmjerene su na prisutnost reaktivnog hepatitisa i traženje drugih ekstraintestinalnih obilježja (Salamunić i sur., 2017). Biokemijskim pretragama u akutnoj fazi bolesti često potvrđujemo hipoalbuminemiju kao posljedicu malnutricije zbog slabog oralnog unosa ili enteropatije praćene gubitkom proteina. Hipoalbuminemija je negativni reaktant akutne faze, odnosno javlja se kao odgovor na upalni proces (Cappello i Morreale, 2016). Budući da IBD zahvaća i oštećuje tanko crijevo, glavno mjesto apsorpcije nutrijenata, uzrokovat će malapsorpciju što se očituje nedostatkom vitamina B12 i folne kiseline. Navedeni deficit izaziva makrocitnu anemiju i hiperhomocistinemiju, faktor rizika za tromboembolijske komplikacije (Pan i sur., 2017).

1.1.5. Serološki biljezi

Nekoliko seroloških biomarkera postalo je dio rutinskog laboratorijskog testiranja za dijagnosticiranje IBD-a. Idealan biomarker mora biti neinvazivan, osjetljiv, specifičan za bolest, ponovljiv, jednostavan za izvođenje te isplativ. Međutim, danas ne postoji idealan biomarker koji zadovoljava sve navedene kriterije za točno dijagnosticiranje, razlikovanje podtipova IBD-a ili za praćenje aktivnosti bolesti. Jednom kad se postavi dijagnoza, biomarkeri mogu pomoći u predviđanju tijeka bolesti i recidiva, procjeni terapijskog odgovora ili praćenju učinkovitosti liječenja. Zbog složenosti i heterogenosti IBD-a, jedan marker ne može predvidjeti aktivnost bolesti u svim slučajevima. Stoga se ispituje mogućnost kombiniranja različitih biomarkera i kliničkih rezultata za poboljšanje točnosti i preciznosti. Biomarkeri IBD-a identificirani su u tkivu crijeva, krvi, stolici i mokraći. Serološki biomarkeri najčešće se koriste za početnu dijagnozu zbog njihove lake dostupnosti, niske cijene i dobro uspostavljenih protokola (Alghoul i sur., 2022; Chen i sur., 2020; Wagatsuma i sur., 2021).

U aktivnoj fazi bolesti dokazane su povišene vrijednosti upalnih biljega, sedimentacije eritrocita (SE) i C-reaktivnog proteina (CRP), no međutim nisu dovoljno osjetljivi niti specifični za postavljanje dijagnoze. CRP je pentamerni protein koji se sintetizira u jetri pod utjecajem citokina. Ima relativno kratak poluživot (oko 19 sati), što ga čini boljim pokazateljem upale od većine proteina akutne faze. Povišene vrijednosti CRP-a opažene su u većini aktivnih stanja CB, dok kod pacijenata s UK koncentracije CRP-a pokazuju mali ili nikakav porast u slučaju aktivne bolesti. Promjena brzine SE nije specifična za IBD i može biti posljedica bilo kojeg upalnog procesa. Vrijednosti SE se mijenjaju kod UK i CB te ih prema ovom parametru ne možemo razlikovati. Prednost CRP-a naspram SE leži u tome što se brže mijenja vrijednost nakon promjene aktivnosti bolesti, ima širi raspon abnormalnih vrijednosti od SE i ne pokazuje varijacije obzirom na dob (Alghoul i sur., 2022).

Perinuklearna anti-neutrofilna citoplazmatska antitijela (p-ANCA) su protutijela koja reagiraju s lizosomalnim enzimima u citoplazmi neutrofila i monocita. Dokazana je njihova specifičnost u dijagnozi UK, pri čemu se titar protutijela mijenja s aktivnošću bolesti. Anti-Saccharomyces cerevisiae antitijela (ASCA) su protutijela koja prepoznaju protein manan i druge komponente stanične stijenki kvasca. Povećani titar ASCA ima visoku specifičnost u prepoznavanju CB. Iako se navedeni biomarkeri mogu koristiti za razlikovanje UK od CB, oba

imaju nisku točnost i osjetljivost. Pozitivni rezultati za oba protutijela nisu jedinstveni za IBD te mogu biti povezani s drugim gastrointestinalnim i upalnim stanjima (Alghoul i sur., 2022; Chen i sur., 2020).

1.1.6. Insuficijencija pankreasa kod upalnih bolesti crijeva

Gušterača (eng. *pancreas*) je žlijezda koja ima ulogu u proizvodnji i sekreciji probavnih enzima u lumen duodenuma, a također je endokrini organ koji sintetizira i izlučuje hormone u krvotok. Sok gušterače produkt je egzokrine funkcije pankreasa koji ima središnju ulogu u procesu probave i apsorpcije hrane. Sastoji se od bikarbonata, vode te probavnih enzima (amilaza, lipaza, elastaza, tripsin, kimotripsin), sa specifičnom sposobnošću probave proteina, ugljikohidrata i masti. Ulazak hrane u gastrointestinalni sustav potiče usklađen međuodnos neuralnih i hormonskih čimbenika koji će potaknuti sekreciju enzima pankreasa. Poremećena ravnoteža ovih zbivanja može dovesti do nutritivnog disbalansa i pothranjenosti te pojave simptoma koji upućuju na maldigestiju i malapsorpciju (Lindkvist, 2013; Rustemović i sur., 2012).

Egzokrina insuficijencija gušterače (eng. *pancreatic exocrine insufficiency*, EPI) odnosi se na smanjenje aktivnosti pankreasnih enzima u lumenu crijeva ispod praga potrebnog za obavljanje probavne funkcije (Ghodeif i Azer, 2023). Može biti posljedica neadekvatne stimulacije gušterače na lučenje probavnih enzima, nedovoljne sekrecije enzima ili opstrukcije izvodnih kanala gušterače. Klinički simptomi obično se javljaju kada je aktivnost enzima gušterače niža od 10 % i uključuju steatoreju, gubitak tjelesne težine, pojačanu nadutost, nelagodu u trbuhu i kliničke znakove nedostatka vitamina (A, D, E, K) i albumina (Radlinger i sur., 2020). Rano otkrivanje EPI može pomoći u prevenciji komplikacija omogućavanjem liječenja s odgovarajućom enzimskom nadomjesnom terapijom. EPI je uzrokovana brojnim poremećajima gušterače, uključujući kronični pankreatitis (CP), cističnu fibrozu (CF), dijabetes, opstrukciju kanala gušterače tumorom ili strikturom, ili gubitkom parenhima nakon resekcije gušterače. Također može biti uzrokovana ekstrapankreasnim stanjima, uključujući operaciju želuca, celijakiju, Zollinger-Ellisonov sindrom i HIV infekciju (Dominici i Franzini, 2002).

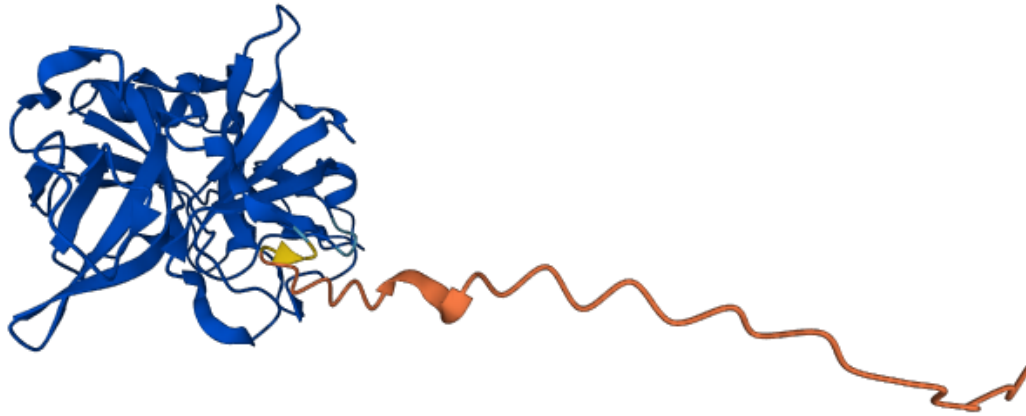
Egzokrina pankreasna insuficijencija može se pojaviti kao ekstraintestinalna manifestacija upalnih bolesti crijeva. Budući da je IBD multisistemski poremećaj, učestalost ekstraintestinalnih manifestacija kreće se od 6 do 47 %. Rezultati istraživanja mogu odstupati ovisno o varijabilnosti

odabira pacijenata te o primjeni testova za postavljanje dijagnoze. Postoji mogućnost da EPI može doprinijeti težim kliničkim manifestacijama kod aktivnog IBD, poput pojačanog dnevnog pražnjenja. Međutim kod navedenih pacijenata, EPI je klinički karakterizirana reverzibilnim i benignim ishodom. Određivanje fekalne elastaze je test koji se koristi u dijagnostici EPI pri čemu je definirana osjetljivost od 54 do 95 % i specifičnost od 80 %. Zabilježeno je da 11,8 do 18 % pacijenta s IBD ima niske vrijednosti fekalne elastaze, što može ukazati na EPI (Marconi i sur., 2008; Rustemović i sur., 2012).

1.2. Fekalna elastaza

Fekalna elastaza (fELA) je specifična humana proteaza koja se sintetizira u acinusnim stanicama gušterače. Elastaze su skupina enzima koji kataliziraju hidrolizu peptidne veze elastina, strukturnog fibroznog proteina izvanstaničnog matriksa (Dominici i Franzini, 2002). U komercijalno dostupnim testovima dokazuje se prisutnost pankreasne elastaze-1, međutim to nije u potpunosti točan naziv budući da se ono što se nekad smatralo elastazom-1 ne eksprimira niti izlučuje u gušterači. Prema HUGO komitetu za gensku nomenklaturu (eng. *HUGO Gene Nomenclature Committee*, HGNC) razlikujemo pet izoformi označenih kao elastaze slične kimotripsinu (eng. *chymotrypsin-like elastase*, CELA). To su CELA1, CELA2A, CELA2B, CELA3A i CELA3B. Komercijalno dostupni testovi detektiraju CELA2 i CELA3 izoforme u gušteračinom soku ili uzorku fecesa. CELA1 prvi je opisani izoenzim otkriven 1949. godine od strane mađarskih znanstvenika Baló i Banga, kao enzim koji je ekspimiran u pankreasu svinje te ima sposobnost hidrolize netopljivog elastina. Zanimljivo je da je humani CELA1 potencijalno funkcionalan, ali nije ekspimiran u humanom pankreasu zbog evolucijski nastalih mutacija u regijama promotora i pojačivača. Kasnije je otkriveno da se izoenzim CELA1 eksprimira u keratinocitima kože (Domínguez-Muñoz i sur., 2017; Tóth i sur., 2017).

Fekalna elastaza je globularni protein s hidrofobnom jezgrom. Polipeptidni lanac sačinjen je od 240 aminokiselina, molekulske mase 26 kDa, te sadrži četiri disulfidna mosta. Sastoji se od dvije domene između kojih se nalazi aktivno središte enzima. Pripada porodici serinskih proteaza budući da ima serin u aktivnom mjestu. Vezno mjesto elastaze ima mali hidrofobni džep koji stabilizira i pravilno pozicionira supstrat, nakon čijeg prepoznavanja dolazi do cijepanja peptidne veze iza malih hidrofobnih aminokiselina (alanin, valin, leucin) u aktivnom mjestu (Dominici i Franzini, 2002).



Slika 2: Prikaz kristalne strukture fekalne elastaze (CELA3B) (preuzeto iz www.genecards.org)

CELA2 ima sposobnost hidrolize elastina, a mjesto cijepanja polipeptidnog lanca je nakon aromatskih i alifatskih aminokiselina. Gen je smješten na kromosomu 1. CELA2A gen kodira funkcionalni protein, a čini oko 10 % ukupnih proteina u gušteračinom soku. CELA3 je anionska proteaza koja ima slabu elastoličku aktivnost. Lako razgrađuje hemoglobin i kazein te hidrolizira male esterske i amidne supstrate nakon alaninskog aminokiselinskog ostatka. Naziva se još i proteaza E, pankreasna endopeptidaza E, elastaza-1, elastaza 3B, pankreasna proteaza koja veže kolesterol. CELA3B čini od 4 do 6 % ukupnih proteina gušteračinog soka (Boros i sur., 2017; Tóth i sur., 2017).

Elastaza-1 sintetizira se u gušterači u inaktivnom prekursorskom obliku (zimogeni), a kasnije se aktivira u duodenumu pod utjecajem tripsina. Veže se na žučne soli i prolazi kroz crijeva uz minimalnu proteolitičku degradaciju. Koncentracija u stolici je oko 5 puta veća od koncentracije u gušteračo-duodenalnom sekretu. Enzim je stabilan u uzorcima stolice do jednog tjedna na sobnoj temperaturi (Dominici i Franzini, 2002). Treba imati na umu da vodenasta stolica kod pacijenata s dijarejom može izazvati lažno snižene rezultate, ali navedena interferencija može se ukloniti liofilizacijom uzorka stolice (Domínguez-Muñoz i sur., 2017).

Pokazalo se da je mjerenje fekalne elastaze praktična i isplativa alternativa invazivnim testovima funkcije gušterače koji se smatraju zlatnim standardom. Neinvazivna je metoda, jednostavna, oduzima manje vremena od izravnih i neizravnih testova te smanjuje rizik od komplikacija. Određivanjem koncentracije fekalne elastaze može se procijeniti egzokrina funkcija gušterače. Ovo je pouzdan test koji se nametnuo kao standard u kliničkoj praksi za procjenu

pacijenata s poremećajima gušterače (kronični pankreatitis, cistična fibroza), ekstrapankreasnim bolestima (diabetes melitus, celijakija, IBD, infekcija HIV-om) i drugim stanjima koja uključuju insuficijenciju gušterače (Maconi i sur., 2008; Rustemović i sur., 2012).

1.3. Kalprotektin

Kalprotektin je proteinski kompleks koji pripada obitelji S-100 kalcij-vezujućih citosolnih proteina. Sastoji se od dva monomera, S100A8 (α podjedinica, 10,8 kDa) i S100A9 (β podjedinica, 13,2 kDa), koji formiraju funkcionalni heterodimer (24 kDa). Svaka S100 podjedinica građena je od dva motiva uzvojnica - omča - uzvojnica koji se naziva EF-ruka. Može vezati dva iona kalcija po monomeru, jedan po svakom motivu EF-ruke. Kalprotektin se nalazi u citoplazmi stanica urođenog imunskog sustava u mirovanju u svom heterodimernom obliku pri čemu nisu popunjena sva vezna mjesta za kalcij. Otpuštanjem kalprotektina u izvanstanični prostor, nailazi na povišene koncentracije kalcijevog iona koje veže na kalcij-vezujuća mjesta. To će dovesti do konformacijske promjene proteina te omogućiti povezivanje dva heterodimera u tetramer. Istraživanja su pokazala da ovaj oblik kalprotektina posjeduje veći afinitet za ione prijelaznih metala, antimikrobnu aktivnost i otpornost na serinske proteaze. Svaki heterodimer sadrži dva vezna mjesta za ione prijelaznih metala. Natječe se s patogenima za dostupne metalne ione (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+}) koji su esencijalni nutrijenti za njihov rast i širenje (Adhikari i sur., 2020; Garcia i sur., 2022).



Slika 3: Prikaz kristalne strukture kalprotektina (preuzeto iz www.rcsb.org)

Kalprotektin najviše je zastupljen u neutrofilima, te čini otprilike polovicu svih citosolnih proteina neutrofila. Također je u manjoj mjeri eksprimiran u citoplazmi monocita, aktiviranih makrofaga, endotelnih i epitelnih stanica. Može se pronaći u serumu, plazmi, mokraći, intestinalnoj tekućini i fecesu (Chatziparasidis i Kantar, 2021). Bakterijski antigeni i upalni medijatori potiču otpuštanje kalprotektina iz neutrofila i monocita, ali može doći do njegovog otpuštanja uslijed disrupcije stanica ili apoptoze. Ima ključnu ulogu u upalnom odgovoru djelujući kao ligand za PRR receptore (eng. *pattern recognition receptors*). Aktivacijom receptora pokreće se unutarstanična signalizacijska kaskada koja će rezultirati ekspresijom upalnih citokina, kemokina te reaktivnih kisikovih spojeva. Također potiče kemotaksiju neutrofila te inducira ispoljavanje endotelnih adhezijskih molekula. Na ovaj način je uključen u stimulaciju upalnog odgovora. Sudjeluje u kontroliranju višestrukih staničnih procesa kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Kalprotektin predstavlja potencijalnu metu za liječenje IBD-a i drugih poremećaja posredovanih upalnom signalizacijom koju inducira (Garcia i sur., 2022; Jukić i sur., 2021).

Fekalni kalprotektin (fKAL) važan je biomarker koji se koristi u kliničkoj praksi za dijagnosticiranje ili praćenje IBD-a. Koncentracija kalprotektina u fecesu neizravna je mjera infiltrata neutrofila u sluznici crijeva. Dobro korelira s ozbiljnošću IBD-a i reflektira endoskopsku aktivnost bolesti. Pokazano je da su pacijenti s IBD-om, uslijed cijeljenja sluznice odnosno remisije u odgovoru na terapiju, posljedično imali značajna sniženja koncentracije fekalnog kalprotektina. Uočeno je da kalprotektin ima bolje rezultate u predviđanju relapsa bolesti unutar 12 mjeseci, osobito kod pacijenata s UK, a potom u CB (Lewis, 2011). Smatra se koristan biomarker u diferencijaciji IBS-a od IBD-a uslijed relativno visoke osjetljivosti i specifičnosti. Promjene u koncentracijama fekalnog kalprotektina nisu specifične za IBD, budući da može biti povišen u drugim crijevnim poremećajima (celijakija, kolorektalni karcinom, divertikulozni poremećaj, crijevne infekcije, upotreba nesteroidnih protuupalnih lijekova i inhibitora protonske pumpe). Također se mijenja u nekim nepatološkim stanjima kao što su dob, pretilost i način života (Wagatsuma i sur., 2021). Kalprotektin otporan je na proteolitičku razgradnju i stabilan je do tjedan dana u fekalnim uzorcima pohranjenim na sobnoj temperaturi. Lako se određuje pomoću imunokemijskih metoda (Siddiqui i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalne bolesti crijeva (IBD), ulcerozni kolitis i Crohnova bolest, u prosjeku se dijagnosticiraju kombinacijom različitih dijagnostičkih testova zbog svoje složene kliničke slike i nespecifičnosti simptoma bolesti. Najvažniji dijagnostički testovi su endoskopija i slikovne metode koje su invazivne, skupe i nepraktične u praćenju aktivnosti IBD-a. Sve veća pozornost usmjerena je prema laboratorijskoj dijagnostici IBD-a, odnosno mjerenjem određenih pretraga procijeniti težinu i mjesto oštećenja sluznice te postojanje upale crijeva (Alghoul i sur., 2022). Ne postoji jasno definirani način prema kojem se mogu razlikovati upalne bolesti crijeva od neupalnih, stoga se javila potreba za pronalaženjem biomarkera koji će s dovoljnom osjetljivošću i specifičnošću identificirati IBD.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da fekalna elastaza i fekalni kalprotektin imaju potencijal za razlikovanje bolesnika s dijagnozom upalne bolesti crijeva od bolesnika s gastrointestinalnim poremećajima koji ne spadaju u skupinu upalnih bolesti crijeva.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kod pacijenata s IBD u odnosu na pacijente s gastrointestinalnim poremećajima kojima ne pripadaju IBD;
2. ispitati postoji li korelacija između fekalnog kalprotektina i fekalne elastaze;
3. ispitati pridonose li fekalna elastaza i fekalni kalprotektin boljoj klasifikaciji pacijenta s IBD od pacijenata s drugim gastrointestinalnim poremećajima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

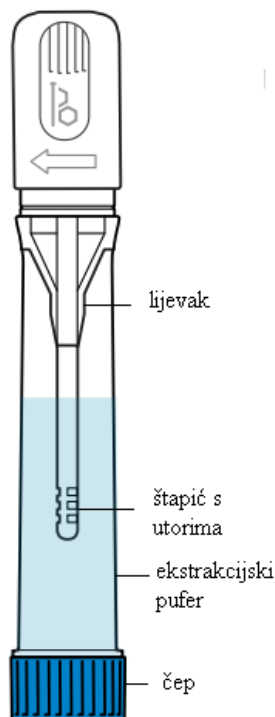
Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, na uzorku ispitanika kojima je određivana koncentracija fekalne elastaze (fELA) i fekalnog kalprotektina (fKAL) iz ostalih ekstrahiranih uzoraka stolice u periodu od siječnja 2021. do siječnja 2022. U istraživanje je bilo uključeno 59 ispitanika (35 žena i 24 muškarca) usklađenih po dobi i spolu. Svi ispitanici su bili pacijenti liječeni u Kliničkoj bolnici Dubrava, a podijeljeni su u dvije skupine označene kao:

- 1) skupina bolesnika s dijagnozom upalne bolesti crijeva (dijagnoza = 1);
- 2) skupina bolesnika s gastrointestinalnim poremećajima koji ne spadaju u kategoriju upalnih bolesti crijeva – celijakija, sindrom iritabilnog kolona, nespecifični kolitis, duodenalni ulkus, abdominalne kolike, gastroenteritis, sarkoidoza i drugi (dijagnoza = 0).

Skupina bolesnika s dijagnozom upalne bolesti crijeva uključivala je 33 ispitanika, a skupina bolesnika s drugim gastrointestinalnim poremećajima 26 ispitanika.

3.1.1 Ekstrakcija uzorka stolice

Uzorkovanje stolice provodi se pomoću komercijalne ekstrakcijske epruvete koja omogućuje prikupljanje standardizirane mase stolice. Za ekstrakciju uzorka stolice korišten je BÜHLMANN CALEX® Cap uređaj, prema preporuci proizvođača reagensa BÜHLMANN fPELA® turbo i BÜHLMANN fCAL® turbo. Uređaj za ekstrakciju stolice sastoji se od štapića s utorima i plastičnog spremnika ispunjenog s 5 mL ekstrakcijskog pufera. Potrebno je uroniti štapić s utorima u uzorak stolice, rotirati ga dok sva mjesta ne budu ispunjena stolicom, a postupak je poželjno ponoviti na 3-5 različitih pozicija. Višak uzorka sa štapića ukloni se trenjem o unutrašnju površinu spremnika, a potom se ujednačeno popunjeni štapić umetne u spremnik s puferom u svoj konačni položaj. CALEX® Cap uređaj se snažno miješa minimalno 30 sekundi na tresilici, može se ponoviti postupak dok se sadržaj utora u potpunosti ne isprazni. Na taj se način uzorak razrijedi s puferom u omjeru 1:500. Nakon ekstrakcije, uređaj se centrifugira 10 minuta na 1000 – 3000 g kako bi se istaložili netopljivi dijelovi stolice, a homogenizirani supernatant se odvoji za daljnju analizu.



Slika 4: Komercijalni uređaj za ekstrakciju stolice (preuzeto i prilagođeno iz originalne specifikacije uređaja za ekstrakciju, CALEX® Cap Device, BÜHLMANN Laboratories AG)

3.1.2. Laboratorijski postupak

Uzorci stolice su sakupljeni i homogenizirani pomoću komercijalne ekstrakcijske tube. Za ovo istraživanje korišteni su uzorci koji su prethodno bili pohranjeni na - 80 °C . Nakon odmrzavanja uzorci su vorteksirani i centrifugirani. Zatim su uzorci postavljeni na stalke i umetnuti u analizator. Svakom uzorku je određen identifikacijski broj te su zadane pretrage od interesa (fELA i fKAL).

3.2. Imunoturbidimetrija

Imunoturbidimetrija je imunokemijska metoda koja služi za dokazivanje prisutnosti ili određivanje koncentracije antigena u uzorku. Svrstava se u skupinu imunokemijskih metoda u otopini bez obilježivača (direktna metoda) (Štraus i sur., 2009). Temelji se na reakciji antigena (analit) i odgovarajućeg specifičnog antitijela pri čemu nastaje kompleks antigen-antitijelo, koji suspendiran u otopini izaziva zamućenje. Za imunoturbidimetrijsku metodu je karakteristično da se odvija u zoni viška antitijela, pri čemu je koncentracija antitijela konstantna tako da količina nastalih kompleksa antigen-antitijelo direktno ovisi o koncentraciji antigena u otopini (Kuntić i Stojić-Vukanić, 2009).

Turbidimetar mjeri apsorpciju svjetlosti na kompleksima u otopini, odnosno razliku intenziteta prolazne zrake svjetlosti kroz kivetu prije i nakon nastanka kompleksa s antitijelima. Što je veća koncentracija imunokompleksa odnosno zamućenje otopine, biti će veća razlika intenziteta ulazne i izlazne zrake svjetlosti, što je direktno proporcionalno koncentraciji antigena (Kuntić i Stojić-Vukanić, 2009). Često se koriste topljivi linearni polimeri kako bi se postigla povećana brzina reakcije, a najučinkovitiji se pokazao polietilenglikol molekulske mase 6000 Da (PEG 6000) (Štraus i sur., 2009).

Mjeri se intenzitet svjetlosti u pravcu prolaska zrake svjetlosti kroz kivetu s otopinom. Izvor svjetlosti je laser, a mjereni signal očitava fotodetektor (UV-VIS spektrofotometar) (Kuntić i Stojić-Vukanić, 2009).

3.3. Fekalna elastaza

3.3.1. Načelo postupka određivanja fELA

Koncentracija fekalne elastaze je mjerena imunoturbidimetrijskom metodom na česticama (eng. *homogeneous particle-enhanced turbidimetric immunoassay*, PETIA) na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 5800 (*Beckman Coulter, Brea, SAD*). U ovom postupku analiziran je ekstrahirani uzorak stolice u kojem nisu prisutni kemijski ili biološki aditivi.

U skladu sa uputama proizvođača (*Beckman Coulter, Brea, SAD*), ekstrakt se inkubira s reakcijskim puferom i pomiješa s polistirenskim nanočesticama obloženim antitijelima na elastazu (imunočestice). Prisutnost fekalne elastaze u uzorku utječe na aglutinaciju imunočestica. Zamućenost otopine je proporcionalna koncentraciji fekalne elastaze u uzorku i povećava se u skladu s formiranjem kompleksa fekalne elastaze i imunočestica. Detektirana apsorpcija svjetlosti se očitava i izrazi pomoću uspostavljene kalibracijske krivulje koja automatski kvantificira koncentraciju fekalne elastaze. Koncentracija fekalne elastaze izražava se kao 1 µg/g stolice.

3.3.3. Potrebna oprema i reagensi

Tablica 1: Oprema, reagensi, kontrole i kalibratori potrebni za određivanje fekalne elastaze u ekstrahiranom uzorku stolice.

Mjerni instrument	Beckman Coulter analitički sustav AU 5800 (<i>Beckman Coulter, Brea, SAD</i>)
Reagensi	BÜHLMANN fPELA® turbo Reagent Kit ✓ R1: Reakcijski pufer (27 mL) – 0,9 % NaCl ✓ R2: Imunočestice (5,1 mL) – polistirenske nanočestice obložene zečjim antitijelima specifičnim za humanu pankreasnu elastazu
Kalibratori	BÜHLMANN fPELA® turbo Calibrator Kit (6 razina x 1 mL)
Kontrole	BÜHLMANN fPELA® turbo Control Kit (3 x 2 razine x 1 mL) ✓ Kontrole u niskoj i visokoj koncentraciji
Uređaj za ekstrakciju	BÜHLMANN CALEX® Cap uređaj ✓ Uređaj za ekstrakciju napunjen ekstrakcijskim puferom

3.3.4. Referentni intervali

Referentni interval za fekalnu elastazu preuzet je iz uputa proizvođača (*BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska*). Navedeno je da na normalnu funkciju pankreasa upućuju vrijednosti $> 200 \mu\text{g/g}$, a sve vrijednosti $< 200 \mu\text{g/g}$ ukazuju na pankreasnu insuficijenciju (Tablica 2).

Tablica 2: Referentni intervali za fekalnu elastazu prema preporukama proizvođača reagensa (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska).

Analit	Vrsta uzorka	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Referentni interval
Fekalna elastaza	ekstrahirani uzorak stolice	$\mu\text{g/g}$	muški, ženski	odrasli	$> 200 \mu\text{g/g}$

3.3.5. Verifikacija

U skladu s CLSI smjernicama (*CLSI EP15-A3: User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline - Third Edition* (CLSI, 2014)) provedena je verifikacija metode za fekalnu elastazu na analizatoru Beckman Coulter AU 5800 (*Beckman Coulter, Brea, SAD*). Verifikacija se provodi prije uvođenja nove metode u rutinski rad laboratorija kako bi procijenili značajke metode koje je validacijom postavio proizvođač i analitičku kvalitetu sustava. Osnovne značajke metode koje smo verificirali uključuju preciznost, istinitost i mjernu nesigurnost za određenu koncentracijsku razinu.

Za verifikaciju metode određivanja fekalne elastaze korištene su dvije razine komercijalnog kontrolnog materijala (BÜHLMANN fPELA® turbo Calibrator Kit, level 1 i level 3). Definirana koncentracija fekalne elastaze u kontroli level 1 iznosi 150 (120-180) µg/g, a u kontroli level 3 iznosi 400 (320-480) µg/g. Verifikaciju preciznosti proveli smo određivanjem fekalne elastaze u kontrolama u triplikatu kroz pet dana. Preciznost uključuje ponovljivost (preciznost unutar serije), preciznost između serija (reproducibilnost) i unutarlaboratorijsku preciznost (ukupna laboratorijska preciznost) te se one računaju iz dobivenih rezultata mjerenja te iskazuju u obliku koeficijenta varijacije (KV). Kriterij prihvatljivosti preuzet iz upute proizvođača iznosi 15,00 %. Istinitost (BIAS) predstavlja odstupanje mjerenja od očekivane vrijednosti certificiranih referentnih materijala. S obzirom da za fekalnu elastazu ne postoji certificirani referentni materijal, BIAS služi samo kao dodatna informativna vrijednost, ali ne i vrijednost kojom možemo definirati istinitost u punom smislu ovog pojma. Kriterij prihvatljivosti za BIAS prema preporuci proizvođača je 42,55 %. Mjerna nesigurnost računa se i procjenjuje iz podataka dobivenih provjerom preciznosti tijekom postupka verifikacije metode. Kriterij prihvatljivosti za mjernu nesigurnost naveden u uputama proizvođača iznosi 45,00 %.

Koeficijenti varijacije izračunati prema dobivenim rezultatima za ponovljivost, levela 1 i 3 iznose 2,40 % i 3,23 %, za reproducibilnost 1,49 % i 2,47 % te za unutarlaboratorijsku preciznost 2,46 % i 3,61 %. Mjerna nesigurnost levela 1 iznosi 5,5 %, a levela 3 je 3,6 %. Prosječni BIAS je 1,90 %. Dobiveni rezultati verifikacije preciznosti unutar su postavljenih kriterija proizvođača te zadovoljavaju uvjete. Mjerna nesigurnost levela 1 i 3 te prosječni BIAS također zadovoljavaju kriterije propisane od strane proizvođača. Time je metoda određivanja fekalne elastaze na Beckman Coulter AU 5800 analizatoru (*Beckman Coulter, Brea, SAD*) verificirana te je spremna za uvođenje u rutinski rad.

3.4. Fekalni kalprotektin

3.4.1 Načelo postupka određivanja fKAL

Fekalni kalprotektin kvantitativno je određivan imunoturbidimetrijskom metodom na česticama (PETIA) na analitičkom sustavu Beckman Coulter AU 5800 (*Beckman Coulter, Brea, SAD*). Ekstrahirani uzorak stolice se inkubira s reakcijskim puferom i polistirenskim nanočesticama obloženim ptičjim antitijelima specifičnim za kalprotektin. Prisutni fekalni kalprotektin u uzorku reagira s antitijelima na nanočesticama iz reagensa i daje netopljive imunokomplekse. Nastali imunokompleksi mijenjaju zamućenost reakcijske otopine čiji porast je proporcionalan koncentraciji kalprotektina u uzorku. Analizator automatski izračunava koncentraciju fekalnog kalprotektina i izražava je u $\mu\text{g/g}$.

Za ovu analizu korišteni su uzorci stolice ekstrahirani pomoću CALEX® Cap uređaja i razrijeđeni u omjeru 1:500 (kao što je opisano u poglavlju 3.1.1.).

3.4.2. Potrebna oprema i reagensi

Tablica 3: Oprema, reagensi, kontrole i kalibratori potrebni za određivanje fekalnog kalprotektina u ekstrahiranom uzorku stolice.

Mjerni instrument	Beckman Coulter analitički sustav AU 5800 (<i>Beckman Coulter, Brea, SAD</i>)
Reagensi	BÜHLMANN fCAL® turbo Reagent Kit ✓ R1: Reakcijski pufer (35 mL) – 0,9 % NaCl ✓ R2: Imunočestice (7 mL) – polistirenske nanočestice obložene ptičjim antitijelima specifičnim na humani kalprotektin
Kalibratori	BÜHLMANN fCAL® turbo Calibrator Kit (6 razina x 1 mL)
Kontrole	BÜHLMANN fCAL® turbo Control Kit (3 x 2 razine x 1 mL) ✓ Kontrole u niskoj i visokoj koncentraciji
Uređaj za ekstrakciju	BÜHLMANN CALEX® Cap uređaj ✓ Uređaj za ekstrakciju napunjen ekstrakcijskim puferom

3.4.3. Referentni intervali

Referentni interval za fKAL prezet je iz uputa proizvođača (*BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska*) (Tablica 4).. Navedeno je da koncentracije fKAL < 80 µg/g upućuju na normalni nalaz, 80 – 160 µg/g na granične koncentracije (odnosno sivu zonu), dok se koncentracije > 160 µg/g smatraju povišenima.

Tablica 4: Referentni intervali za fekalni kalprotektin preuzeti od proizvođača reagensa (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska).

Analit	Vrsta uzorka	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Referentni interval
Fekalni kalprotektin	ekstrahirani uzorak stolice	µg/g	muški, ženski	odrasli	< 80 µg/g

3.5. Statistička obrada podataka

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišten je računalni program *MedCalc Statistical Software verzija 18.11.6 (MedCalc Software Bvba, Ostend, Belgium)*. Normalnost distribucije kontinuiranih podataka ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom, ovisno o kojem odabiremo parametrijske ili neparametrijske testove za analizu skupova podataka. Svi su rezultati interpretirani u odnosu na razinu značajnosti $P = 0,05$. Sve varijable su prikazane u obliku medijana i interkvartilnog raspona. Za usporedbu dviju varijabli korišten je neparametrijski Mann-Whitney test. Ispitano je postojanje statistički značajne razlike u koncentracijama fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina između medijana dviju skupina čiji podaci nisu slijedili normalnu razdiobu. Ukoliko je dobivena vrijednost $P > 0,05$ nema statistički značajne razlike između analiziranih skupina. Za utvrđivanje korelacije između varijabli izračunati koeficijent korelacije (r) interpretiran je prema Coltonovim kriterijima (Colton, 1963) (Tablica 5). Koeficijent korelacije može imati vrijednost između -1 i 1 . Korelacija je slabija ako se vrijednost približava nuli. Ako se jedna varijabla povećava povećanjem druge, korelacija će biti pozitivna, a ako se jedna varijabla smanjuje dok se druga povećava, korelacija će biti negativna.

Tablica 5: Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu (Colton, 1963)

Koeficijent korelacije (r)	Povezanost
0 do $\pm 0,25$	Nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	Slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	Umjerena do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do ± 1	Dobra do izvrsna povezanost

Logistička regresija podrazumijeva statističku analizu skupa podataka u kojoj je zavisna varijabla kategorijska (kada postoje dvije skupine). Primarna zadaća logističke regresije je odrediti omjer vjerojatnosti promjene skupine zavisne varijable (prelazak iz jedne skupine u drugu) ukoliko se promjeni nezavisna varijabla. ROC (eng. *receiver operating characteristics*) analizom određujemo optimalnu graničnu vrijednost kojom s najboljom specifičnošću i osjetljivošću razlikujemo dvije ispitivane skupine.

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja prikazani su tablično, opisno i grafički. U istraživanju su korišteni podaci 59 ispitanika, 35 žena i 24 muškarca, medijana dobi 51 (30 – 62) godina .

Tablica 6: Dob ispitanika podijeljenih prema spolu

Spol	Broj ispitanika	Dob (medijan i interkvartilni raspon)
Žene	35	43 (30 – 62)
Muškarci	24	59 (36 – 63)

Prosječna starost žena je 48 godina, a medijan iznosi 43 godine. Prosječna dob muškaraca je 51 godina, a medijan iznosi 59 godina.

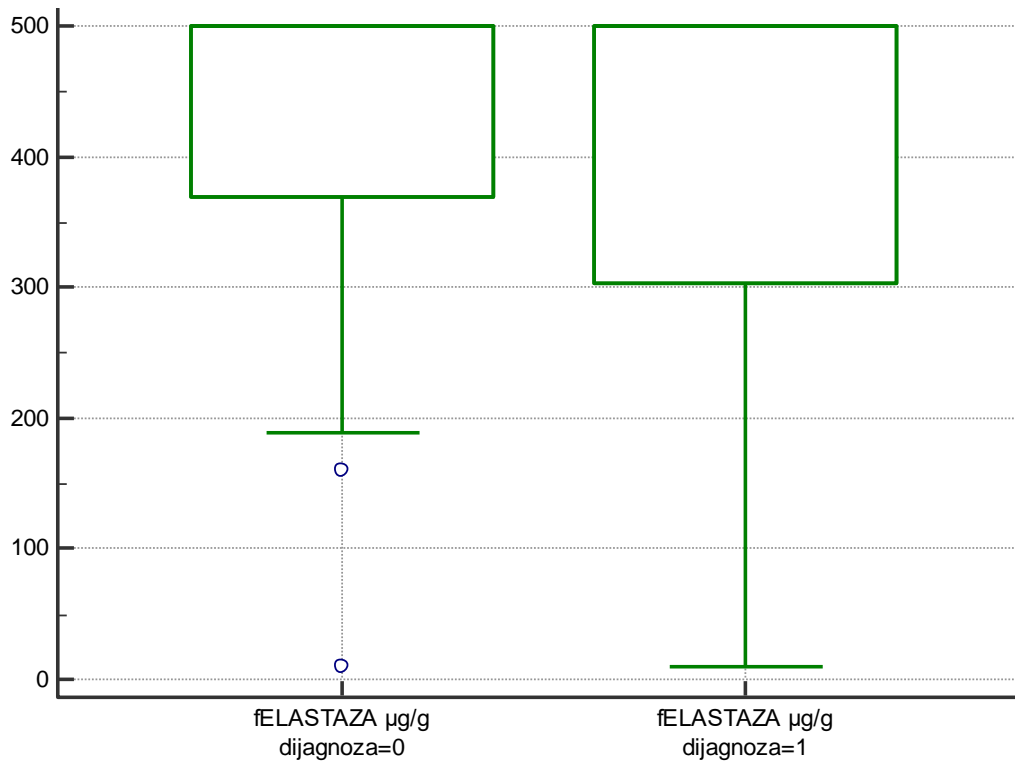
Ispitano je postoji li statistički značajna razlika u dobi između skupine s dijagnozom IBD i skupine bez dijagnosticiranog IBD-a. Neparometrijskom statistikom, odnosno uporabom Mann-Whitney testa, dobiveno je da nema statistički značajne razlike u dobi ispitivanih skupina ($P = 0,593$).

U *Tablici 7* prikazane su izmjerene koncentracije fekalne elastaze (fELA) i fekalnog kalprotektina (fKAL) analiziranih skupina. Budući da distribucija podataka ne slijedi normalnu razdiobu izrađena je neparametrijska statistika, a dobiveni rezultati unutar skupine izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 7: Koncentracije fELA ($\mu\text{g/g}$) i fKAL ($\mu\text{g/g}$) prema ispitivanim skupinama bolesnika

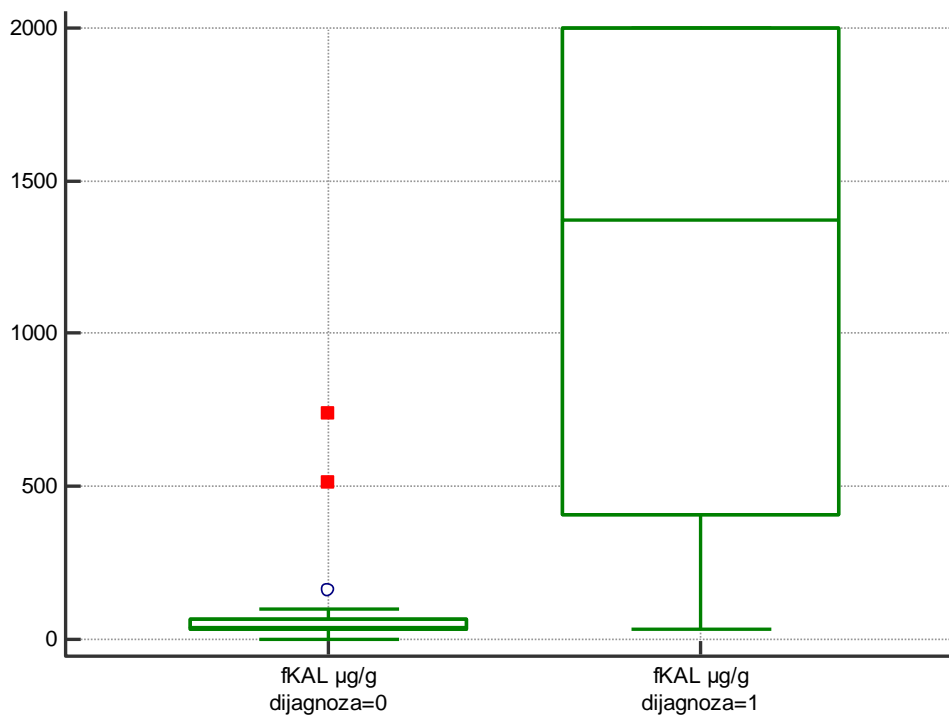
Skupina	Broj ispitanika	fELA ($\mu\text{g/g}$) medijan i interkvartilni raspon	fKAL ($\mu\text{g/g}$) medijan i interkvartilni raspon
Upalne bolesti crijeva (IBD)	33	500 (10 – 500)	1370,3 (35,3 – 2000,0)
Ostali GI poremećaji (isključena IBD)	26	500 (10 – 500)	38,7 (2,0 – 740,6)

Mann-Whitney testom ispitano je postojanje statistički značajne razlike koncentracija fekalne elastaze u dvije ispitivane skupine. Navedenim testom dobiveno je da nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji fELA u skupini IBD (dijagnoza = 1) i skupini s isključenim IBD-om (dijagnoza = 0) ($P = 0,782$). Medijan koncentracije fELA u obje proučavane skupine iznosio je $500 \mu\text{g/g}$. Rezultati su također prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom uporabom "box and whisker" dijagrama (*Slika 5*).



Slika 5: Grafički prikaz koncentracija fekalne elastaze (fELA) između skupine bolesnika s IBD-om (dijagnoza = 1) i skupine bez IBD (dijagnoza = 0).

Mann-Whitney testom također je analizirano postojanje statistički značajnih razlika u koncentraciji fekalnog kalprotektina između skupina. Ovim testom nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji fekalnog kalprotektina između skupine bolesnika s IBD-om i skupine bez IBD ($P < 0,001$). Utvrđeno je da su koncentracije fKAL kod pacijenta s IBD-om (dijagnoza = 1) statistički značajno više nego koncentracije fKAL kod ispitanika s drugim GI poremećajima (dijagnoza = 0). Medijan koncentracija fKAL kod bolesnika s IBD-om iznosio je 1370,3 $\mu\text{g/g}$, a kod pacijenata s ostalim GI poremećajima iznosio je 38,7 $\mu\text{g/g}$. Rezultati su također prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom uporabom "box and whisker" dijagrama (Slika 6).



Slika 6: Grafički prikaz koncentracija fekalnog kalprotektina (fKAL) između skupine bolesnika s IBD-om (dijagnoza = 1) i skupine bez IBD (dijagnoza = 0).

Tablica 8: Koeficijent korelacije (r) između varijabli fKAL (µg/g) i fELA (µg/g).

Varijabla X	Varijabla Y	Skupina ispitanika	Veličina uzorka	Koeficijent korelacije (r)	Razina značajnosti (P)
fKAL (µg/g)	fELA (µg/g)	Svi ispitanici	59	-0,2463	0,060
fKAL (µg/g)	fELA (µg/g)	Bolesnici s IBD	33	-0,3433	0,051

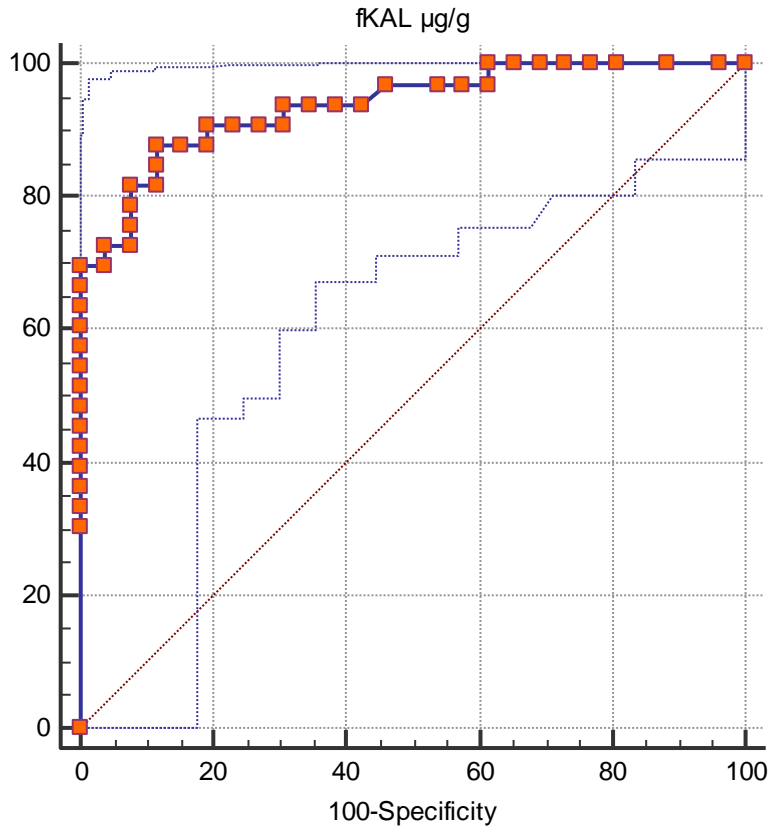
Ispitana je korelacija između vrijednosti koncentracija fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kod svih ispitanika te u odabranoj skupini bolesnika s dijagnozom IBD (dijagnoza = 1). Određene su vrijednosti koeficijenta korelacije (r) koje su prikazane u *Tablici 8*. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne korelacije između vrijednosti koncentracija fELA i fKAL kod svih ispitanika (P = 0,060). Odabirom samo skupine pacijenata s IBD-om dobivena je slaba negativna korelacija (r = -0,2463), na granici statističke značajnosti (P = 0,051).

Tablica 9: Prognošički potencijal varijable fKAL ($\mu\text{g/g}$) u diskriminaciji pacijenata s IBD-om

Varijabla	Omjer izgleda (OR)	95 %-tni interval pouzdanosti	Razina značajnosti (P)
fKAL ($\mu\text{g/g}$)	1,0047	1,0017 – 1,0078	0,003

Logističkom regresijom ispitano je postojanje povezanosti koncentracija fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina s razlikovanjem dijagnoza. Model je u cijelosti statistički značajan ($P < 0,001$). Fekalna elastaza nije statistički značajna za model, odnosno nije povezana s razlikovanjem dvije kategorije bolesti. Fekalni kalprotektin se istaknuo kao statistički značajan biljeg u razlikovanju ispitivanih skupina ($P < 0,05$). Omjer izgleda (eng. *odds ratio*, OR) da će vrijednost fekalnog kalprotektina ukazati na IBD ima vrijednost 1,0047 uz 95 %-tni interval pouzdanosti (1,0017 – 1,0078). Postotak ispravno razvrstanih ispitanika s dijagnozom IBD koristeći koncentracije fekalnog kalprotektina je 84,75 %.

ROC analizom utvrđene su dijagnostička specifičnost i osjetljivost fekalnog kalprotektina u razlikovanju pacijenata s dijagnozom IBD od pacijenata s ostalim GI poremećajima. Definirana je optimalna granična vrijednost fekalnog kalprotektina $> 99 \mu\text{g/g}$, koja s najboljom osjetljivošću (87,88 %) i specifičnošću (88,46 %) odvaja IBD skupinu od druge ispitivane skupine. Površina ispod krivulje (eng. *area under the curve*, AUC) iznosila je 0,938 ($P < 0,001$). Svaka točka ROC krivulje predstavlja par osjetljivosti i specifičnosti koji odgovara određenom pragu odlučivanja (Slika 7).



Slika 7: ROC krivulja odnosa dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti testa fKAL ovisno o pojedinoj graničnoj vrijednosti

5. RASPRAVA

Upalna bolest crijeva karakterizirana je idiopatskom kroničnom i rekurentnom upalom gastrointestinalnog trakta. Budući da je riječ o multisistemskom poremećaju, može zahvatiti mnoge ekstraintestinalne organe kao što je gušterača. Fekalna elastaza je specifični enzim pankreasa koji se ne razgrađuje prolaskom kroz crijeva i korelira s egzokrinom funkcijom pankreasa. Cilj istraživanja bio je analizom rezultata fELA i fKAL ispitati njihov potencijal u razlikovanju gastrointestinalnih poremećaja ovisno o prisutnosti odnosno odsustvu bolesti IBD.

Rustemović i sur. (2009) su mjernjem fekalne elastaze procijenili povezanost upalnih bolesti crijeva i insuficijencije pankreasa kao ekstraintestinalne manifestacije IBD. Insuficijencija pankreasa pronađena je u 10,89 % ispitivanih pacijenata s dijagnozom IBD što upućuje na povezanost te dvije dijagnoze.

Schappi i sur. (2002) su određivanjem fekalne elastaze usporedili morfologiju sluznice crijeva s primarnim crijevnim bolestima (uključujući IBD). Pokazano je da upala sluznice ima negativan učinak na egzokrinu funkciju pankreasa, odnosno da utječe na smanjenu sekreciju fELA. Ova povezanost je slabo shvaćena, uz pretpostavku da je poremećena enteroendokrina ili neuroendokrina stimulacija pankreasa.

Maconi i sur. (2008) istražili su prevalenciju insuficijencije pankreasa kod pacijenata s IBD-om, pri čemu su kod 18 % bolesnika zabilježene koncentracije fELA < 200 µg/g, od kojih je 7 % imalo niže koncentracije fELA (< 100 µg/g) što upućuje na tešku EPI.

U ovom istraživanju ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina uključuje pacijente s dijagnozom IBD-a, dok druga obuhvaća ostala gastrointestinalna oboljenja uz isključenu dijagnozu IBD. Rezultati su pokazali da se koncentracije fELA između dvije ispitivane skupine nisu statistički značajno razlikovale. To znači da dobiveni rezultati ne ukazuju na dodatnu vrijednost fELA u diferencijalno dijagnostičkom pristupu. Snižene koncentracije fELA mogu se izmjeriti u drugim gastrointestinalnim poremećajima (celijakija, IBS, diabetes melitus), što je u skladu s literaturnim podacima (Domínguez-Muñoz i sur., 2017).

Određivanjem koncentracije fKAL dobivena je statistički značajna razlika između analiziranih skupina u smislu statistički značajno veće koncentracije fekalnog kalprotektina kod dijagnoze IBD u odnosu na skupinu oboljenja s isključenom dijagnozom IBD. Medijan koncentracije fKAL kod bolesnika s dijagnozom IBD bio je znatno viši od medijana pacijenata

koji su imali druge GI poremećaje. Budući da se fKAL otpušta iz stanica urođenog imunosnog sustava uslijed morfoloških promjena upaljene sluznice crijeva, izmjerene visoke koncentracije fKAL u skladu su s IBD poremećajem (Walsham i Sherwood, 2016). Iz toga proizlazi moguća korisnost fKAL u isključivanju IBD-a kod pacijenata sa simptomima abdominalne boli i dijareje kad su snižene koncentracije fKAL. Ovi rezultati su u skladu s meta analizom koju su proveli Menees i sur. (2015), a u kojoj je zaključeno da vrijednosti fKAL < 40 µg/g smanjuju potrebu za invazivnom kolonoskopijom (Khaki-Khatibi i sur., 2020).

Prilikom odabira skupine s dijagnozom IBD-a, dobivena je slaba negativna korelacija fELA i fKAL, iako na granici statističke značajnosti (P = 0,051). Negativna korelacija odražava povišenja koncentracije fKAL u aktivnom IBD, dok se koncentracija fELA smanjuje. Mogući uzrok rezultata slabe povezanosti je mali broj ispitanika, stoga bi bilo korisno da buduća istraživanja uključe veći broj ispitanika. Pezzilli i sur. (2007) istraživali su moguću prisutnost upale crijeva (procijenjenu preko analize fKAL) kod pacijenata s bolestima gušterače (egzokrina funkcija procijenjena određivanjem fELA). Dokazali su da su niske koncentracije fELA značajno povezane s povećanim vrijednostima fKAL, vjerojatno zbog narušene ravnoteže u crijevima uslijed upale. Crijeva imaju ključnu ulogu u aktivaciji sekrecije pankreasnih enzima i u procesu koji osigurava optimalnu probavu i apsorpciju hrane.

U logističko regresijskom testu analizirano je mogu li ispitivani biljezi doprinijeti da iz njihovih vrijednosti možemo zaključiti ima li pacijent IBD. Fekalni kalprotektin pokazao je statistički značajan potencijal u razlikovanju kategorije s IBD-om od one bez IBD, dok fELA nije pokazala dijagnostički potencijal za ovaj model. Budući da je za fKAL omjer izgleda veći od 1 i 95 %-tni interval ne obuhvaća 1,00, postoji razlika u koncentracijama fKAL-a između dvije ispitivane skupine. O tome nam govori i postotak ispravno razvrstanih ispitanika s obzirom na koncentraciju fKAL. Dakle, prema ovom istraživanju, fKAL može ispravno klasificirati 84,75 % bolesnika s dijagnozom IBD.

Von Roon i sur. (2007) objedinili su podatke 30 istraživanja te procijenili vrijednost dijagnostičke osjetljivosti (89 %) i specifičnosti (81 %) ako je granična koncentracija fekalnog kalprotektina 50 µg/g kod pacijenata s IBD-om u usporedbi s onima bez IBD. U analiziranim istraživanjima koja su koristila graničnu koncentraciju fKAL od 100 µg/g, dobivena je dijagnostička osjetljivost 98 % te specifičnost 91 %. Može se zaključiti da analiza fKAL ima veću osjetljivost kada se koristi viši prag za definiranje pozitivnog testa. U našem istraživanju dobivena

je granična vrijednost koncentracije fKAL od 99 $\mu\text{g/g}$ koja s visokom dijagnostičkom osjetljivošću (87,88 %) i specifičnošću (88,46 %) postiže najučinkovitiju diskriminaciju pacijenata s IBD-om i bez IBD-a. Budući da površina ispod ROC krivulje korelira s dijagnostičkom točnošću ispitivane pretrage, iz dobivene površine može se reći da fKAL ima izvrsnu dijagnostičku točnost u otkrivanju IBD-a.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, obrade podataka, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama fekalne elastaze između skupine pacijenata s dijagnozom upalne bolesti crijeva i skupine pacijenata s ostalim gastrointestinalnim poremećajima.
- Fekalni kalprotektin pokazuje statistički značajnu razliku između dvije ispitivane skupine (viši je u skupini pacijenata s dijagnozom upalne bolesti crijeva).
- Snižene koncentracije fekalne elastaze pokazuju slabu negativnu korelaciju s povišenim koncentracijama fekalnog kalprotektina kod pacijenata s dijagnozom aktivnog IBD-a.
- Fekalni kalprotektin ima statistički značajan potencijal u klasifikaciji pacijenata s IBD-om, pri čemu vrijednosti fKAL veće od 99 $\mu\text{g/g}$ s najboljom dijagnostičkom osjetljivošću (87,88 %) i specifičnošću (88,46 %) odvajaju pacijente s IBD-om od pacijenata s drugim gastrointestinalnim poremećajima.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

APC - antigen prezentirajuće stanice (eng. *antigen-presenting cells*)

ASCA - anti-Saccharomyces cerevisiae antitijela

ATG16L1 - eng. *autophagy related 16 like 1 gene*

AUC - površina ispod krivulje (eng. *area under the curve*)

CB - Crohnova bolest

CELA - elastaza slična kimotripsinu (engl. *chymotrypsin-like elastase*)

CRP - C-reaktivni protein

EPI - egzokrina insuficijencija gušterače (eng. *pancreatic exocrine insufficiency*)

fELA - fekalna elastaza

fKAL - fekalni kalprotektin

GGT - gama-glutamil transferaza

GI -gastrointestinalni

GWAS - cjelogenomska asocijacijska studija (eng. *genome-wide association study*)

HGNC - HUGO komitet za gensku nomenklaturu (eng. *HUGO Gene Nomenclature Committee*)

IBD - upalne bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*)

IBS - sindrom iritabilnog kolona (eng. *irritable bowel syndrome*)

IFN - interferon

IL - interleukin

IRGM - eng. *immunity-related GTPase family M protein*

KV - koeficijent varijacije

MDP - muramil dipeptid

NLR - eng. *NOD-like receptor*

NOD2 - eng. *nucleotide-binding oligomerization domain 2*

OR - omjer izgleda (eng. *odds ratio*)

p-ANCA - perinuklearna anti-neutrofilna citoplazmatska antitijela (eng. *perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

PETIA - imunoturbidimetrijska metoda na česticama (eng. *homogeneous particle-enhanced turbidimetric immunoassay*)

r - koeficijent korelacije

ROC - eng. *receiver operating characteristics*

SE - sedimentacija eritrocita

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms*)

Th - eng. *T helper cells*

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*)

UK - ulcerozni kolitis

8. LITERATURA

Adhikari J, Stephan JR, Rempel DL, Nolan EM, Gross ML. Calcium Binding to the Innate Immune Protein Human Calprotectin Revealed by Integrated Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(31), 13372-13383.

Alghoul Z, Yang C, Merlin D. The Current Status of Molecular Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Biomedicines*, 2022, 10, 1492.

Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*, 2012, 380, 1590-1605.

Boros E, Szabó A, Zboray K, Heja D, Pal G, Sahin-Toth M. Overlapping Specificity of Duplicated Human Pancreatic Elastase 3 Isoforms and Archetypal Porcine Elastase 1 Provides Clues to Evolution of Digestive Enzymes. *J Biol Chem*, 2017, 292(7), 2690-2702.

Cappello M, Morreale GC. The Role of Laboratory Tests in Crohn's Disease. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 2016, 9, 51-62.

Chatziparasidis G, Kantar A. Calprotectin: An Ignored Biomarker of Neutrophilia in Pediatric Respiratory Diseases. *Children (Basel)*, 2021, 8(6), 428.

Chen P, Zhou G, Lin J, Li L, Zeng Z, Chen M, Zhang S. Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7, 123.

Chow DKL, Leong RWL, Lai LH, Wong GLH, Leung W, Chan FKL, Sung JJY. Changes in Crohn's disease phenotype over time in the Chinese population: Validation of the Montreal classification system. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14(4), 536–541.

CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias. Third Edition. 2014, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, CLSI document EP15-A3.

Colton T. A model for selecting one of two medical treatments. *JASA*, 1963, 58, 388-400.

Cushing K, Higgins PDR. Management of Crohn Disease: A Review. *JAMA*, 2021, 325(1), 69-80.

Čipčić Paljetak H, Barešić A, Panek M, Perić M, Matijašić M, Lojkić I, Barišić A, Vranešić Bender D, Ljubas Kelečić D, Brinar M, Kalauz M, Miličević M, Grgić D, Turk N, Karas I, Čuković Čavka S, Krznarić Ž, Verbanac D. Gut microbiota in mucosa and feces of newly diagnosed, treatment-naïve adult inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome patients. *Gut Microbes*. 2022, 14, 21.

Domínguez-Muñoz JE, Hardt P, Lerch MM, Löhr MJ. Potential for Screening for Pancreatic Exocrine Insufficiency Using the Fecal Elastase-1 Test. *Digestive Diseases and Sciences*, 2017, 62(5), 1119–1130.

Dominici R, Franzini C. Fecal Elastase-1 as a Test for Pancreatic Function: a Review. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(4), 325-332.

Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin Proc*, 2017, 92(7), 1088-1103.

Garcia V, Perera YR, Chazin WJ. A Structural Perspective on Calprotectin as a Ligand of Receptors Mediating Inflammation and Potential Drug Target. *Biomolecules*, 2022, 12, 519.

Ghodeif AO, Azer SA. Pancreatic Insufficiency. U: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555926/>

Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*, 2019, 7247238.

Jukić A, Bakiri L, Wagner EF, Tilg H, Adolph TE. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut*, 2021, 70(10), 1978-1988.

Kaitha S, Bashir M, Ali T. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2015, 6(3), 62-72.

Katičić M. Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva. *Acta Clin Croat*, 2013, 67, 93-110.

Kaur A, Goggolidou P. Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *Journal of Inflammation*, 2020, 17.

Khaki-Khatibi F, Qujeq D, Kashifard M, Moein S, Maniati M, Vaghari-Tabari M. Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta*, 2020, 510, 556-565.

Klein A, Eliakim R. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010, 3(4), 1084-1092.

Kuntić V, Stojić-Vukanić Z. Imunonefelometrija i imunoturbidimetrija: teorijski principi, instrumenti i primena. *Arh.farm*, 2009, 59, 536-550.

Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2011, 140(6), 1817-1826.

Lindkvist B. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World J Gastroenterol*. 2013, 19(42), 7258-7266.

Lynch WD, Hsu R. Ulcerative Colitis. U: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459282/>

Ljubičić N, Bišćanin A, Nikić I, Budimir I, Nikolić M, Pavić T. Endoscopic balloon dilatation in Crohn's disease: case report. *Acta Clin Croat*, 2013, 52, 374-379.

Maconi G, Dominici R, Molteni M, Ardizzone S, Bosani M, Ferrara E, Gallus S, Panteghini M, Bianchi Porro G. Prevalence of Pancreatic Insufficiency in Inflammatory Bowel Diseases. Assessment by Fecal Elastase-1. *Dig Dis Sci*, 2008, 53, 262–270.

Marušić M, Klemenčić A. Ulcerozni kolitis: klinički tijek i komplikacije bolesti. U: *Upalne Bolesti Crijeva: od etiologije do terapije*. Marušić M, urednik, Zagreb, Klinička bolnica Sveti Duh; Klinika za unutarnje bolesti, 2017, 20.

McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. U: *StatPearls [Internet]*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>

Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am. J. Gastroenterol*, 2015, 110, 444–454.

Mohan HM, Coffey JC. Surgical treatment of intestinal stricture in inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 2020, 21(6), 355-359.

Pan Y, Liu Y, Guo H, et al. Associations between Folate and Vitamin B12 Levels and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 2017, 9(4), 382.

Pezzilli R, Barassi A, Morselli-Labate A M, Fantini L, Tomassetti P, Campana D, Casadei R, Finazzi S, Melzi D'Eril G, Corinaldesi R. Fecal calprotectin and elastase 1 determinations in patients with pancreatic diseases: a possible link between pancreatic insufficiency and intestinal inflammation. *Journal of Gastroenterology*, 2007, 42(9), 754–760.

Politis DS, Katsanos KH, Tsianos EV, Christodoulou DK. Pseudopolyps in inflammatory bowel diseases: Have we learned enough? *World J Gastroenterol*, 2017, 23(9), 1541-1551.

Radlinger B, Ramoser G, Kaser S. Exocrine Pancreatic Insufficiency in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*, 2020, 20(6), 18.

Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases, *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(1), 155-165.

Rustemović N, Krznarić Ž, Vranešić Bender D, Ostojić R, Čuković Čavka S, Milić S, Anić B, Ljubičić N, Mesarić J, Štimac D. Hrvatske smjernice za liječenje egzokrine pankreasne insuficijencije. *Liječnički vjesnik*, 2012, 134(5-6).

Rustemović N, Grubelić Ravić K, Čuković Čavka S, Anzulović D, Brljak J, Rogić D, Pulanić R, Vucelić B, Rojnić Kuzman M. P081 - Pancreatic Insufficiency in Inflammatory Bowel Disease. Assessment by Fecal Elastase-1. *Journal of Crohn's and Colitis*, Zagreb, 2009, 43.

Salamunić I, Tandara L, Tonkić A. Bolesti želuca, gušterače i crijeva. U: *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. Topić E, Primorac D, Štefanović M, urednici, Medicinska naklada, 2017, str.122-123.

Schappi MG, Smith VV, Cubitt D, Milla PJ, Lindley KJ. Fecal elastase 1 concentration is a marker of duodenal enteropathy. *Arch Dis Child*. 2002, 86, 50–53.

Segal JP, LeBlanc JF, Hart AL. Ulcerative colitis: an update. *Clinical Medicine*, 2021, 21(2), 135-139.

Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*, 2019, 12(2), 113-122.

Siddiqui I, Majid H, Abid S. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2017, 8(1), 39-46.

Štraus B, Barišić K. Proteini. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 193-197.

Torres J, Mehandru S, Colombel AF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*, 2017, 389, 1741–55.

Tóth AZ, Szabó A, Hegyi E, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Detection of human elastase isoforms by the ScheBo Pancreatic Elastase 1 Test. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(6), 606–614.

Ulcerative colitis, <https://www.hopkinsmedicine.org>, pristupljeno 25.5.2023.

Ulcerozni kolitis, <https://hucuk.hr/>, pristupljeno 25.5.2023.

von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, Paraskeva P, Tekkis PP. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am. J. Gastroenterol*, 2007, 102, 803–813.

Wagatsuma K, Yokoyama Y, Nakase H. Role of Biomarkers in the Diagnosis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Life (Basel)*, 2021,11(12), 1375.

Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*, 2016, 9, 21-29.

Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease, *Dtsch Arztebl Int*, 2016, 113(5), 72-82.

Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1), 91-99.

9. SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva (IBD), ulcerozni kolitis i Crohnova bolest, složeni su kronični upalni poremećaji koji zahvaćaju različite dijelove sluznice gastrointestinalnog trakta, uz kontinuirane izmjene stanja remisije i relapsa. Većina kliničkih simptoma nije specifična za IBD i mogu se javiti kod drugih upalnih bolesti. Egzokrina insuficijencija pankreasa može se javiti kao posljedica brojnih poremećaja, a često se javlja kao ekstraintestinalna manifestacija upalnih bolesti crijeva. Fekalna elastaza je enzim pankreasa koji se ne razgrađuje prolaskom kroz crijeva i korelira s egzokrinom funkcijom pankreasa. Fekalni kalprotektin je protein koji sudjeluje u stimulaciji upalnog odgovora, a njegova koncentracija u fecesu neizravna je mjera infiltrata neutrofila u sluznici crijeva.

Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kako bi se ispitao njihov potencijal u razlikovanju gastrointestinalnih poremećaja ovisno o prisutnosti odnosno odsustvu IBD.

Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine (prva uključuje pacijente s dijagnozom IBD-a, a druga gastrointestinalna oboljenja uz isključenu dijagnozu IBD). Iz ostalih ekstrahiranih uzoraka stolice 59 ispitanika određene su koncentracije fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina imunoturbidimetrijskim metodama na analitičkom sustavu *Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, SAD)*.

Rezultati istraživanja su pokazali da nema razlika u koncentraciji fekalne elastaze između pacijenata s dijagnozom IBD-a i pacijenata s ostalim gastrointestinalnim poremećajima. Bolesnici s dijagnozom IBD-a imali su visoke koncentracije fekalnog kalprotektina u odnosu na skupinu bolesnika koji nemaju navedeni poremećaj. Snižene koncentracije fekalne elastaze pokazale su slabu korelaciju s povišenim koncentracijama fekalnog kalprotektina kod pacijenata s dijagnozom aktivnog IBD-a. Fekalni kalprotektin ima značajan dijagnostički potencijal te može s visokom dijagnostičkom osjetljivošću (87,88 %) i specifičnošću (88,46 %) odvojiti pacijente s IBD-om od pacijenata s drugim gastrointestinalnim poremećajima.

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da fekalna elastaza nema dodatnu vrijednost u diferencijalno dijagnostičkom pristupu IBD-a, dok fekalni kalprotektin ima izvrsnu dijagnostičku točnost u otkrivanju IBD-a.

SUMMARY

Inflammatory bowel disease (IBD), ulcerative colitis and Crohn's disease, are complex chronic inflammatory disorders that affect different parts of the gastrointestinal tract mucosa, with continuous changes in the state of remission and relapse. Most of the clinical symptoms are not specific to IBD and can occur in other inflammatory diseases. Pancreatic exocrine insufficiency can appear as a result of numerous disorders, and often as an extraintestinal manifestation of inflammatory bowel diseases. Fecal elastase is a pancreatic enzyme that is not degraded when passing through the intestines and correlates with the exocrine function of the pancreas. Fecal calprotectin is a protein that participates in the stimulation of the inflammatory response, and its concentrations in feces are an indirect measure of the neutrophil infiltrate in the intestinal mucosa.

The aim of this work was to analyze the results of fecal elastase and fecal calprotectin in order to examine their potential in differentiating gastrointestinal disorders depending on the presence or absence of IBD.

Subjects were divided into two groups (the first included patients with a diagnosis of IBD, and the second included patients with gastrointestinal diseases without IBD). From the remaining extracted stool samples of 59 subjects, the concentrations of fecal elastase and fecal calprotectin were determined by immunoturbidimetric methods on the analytical system *Beckman Coulter AU 5800* (Beckman Coulter, Brea, USA).

The research results showed that there were no differences in fecal elastase concentrations between patients with a diagnosis of IBD and patients with other gastrointestinal disorders. Patients with a diagnosis of IBD had high concentrations of fecal calprotectin compared to the group of patients without the mentioned disorder. Decreased fecal elastase concentrations showed a weak correlation with elevated fecal calprotectin concentrations in patients diagnosed with active IBD. Fecal calprotectin has significant diagnostic potential and can distinguish patients with IBD from patients with other gastrointestinal disorders with high sensitivity (87.88%) and specificity (88.46%).

Based on the obtained results, it is concluded that fecal elastase has no additional value in the differential diagnostic approach of IBD, while fecal calprotectin has excellent diagnostic accuracy in detecting IBD.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Analiza rezultata fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kod pacijenata s i bez upalne bolesti crijeva

Ana Rukavina

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva (IBD), ulcerozni kolitis i Crohnova bolest, složeni su kronični upalni poremećaji koji zahvaćaju različite dijelove sluznice gastrointestinalnog trakta, uz kontinuirane izmjenjene stanja remisije i relapsa. Većina kliničkih simptoma nije specifična za IBD i mogu se javiti kod drugih upalnih bolesti. Egzokrina insuficijencija pankreasa može se javiti kao posljedica brojnih poremećaja, a često se javlja kao ekstraintestinalna manifestacija upalnih bolesti crijeva. Fekalna elastaza je enzim pankreasa koji se ne razgrađuje prolaskom kroz crijeva i korelira s egzokrinom funkcijom pankreasa. Fekalni kalprotektin je protein koji sudjeluje u stimulaciji upalnog odgovora, a njegova koncentracija u fecesu neizravna je mjera infiltrata neutrofila u sluznici crijeva. Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kako bi se ispitao njihov potencijal u razlikovanju gastrointestinalnih poremećaja ovisno o prisutnosti odnosno odsustvu IBD. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine (prva uključuje pacijente s dijagnozom IBD-a, a druga gastrointestinalna oboljenja uz isključenu dijagnozu IBD). Iz ostalih ekstrahiranih uzoraka stolice 59 ispitanika određene su koncentracije fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina imunoturbidimetrijskim metodama na analitičkom sustavu Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, SAD). Rezultati istraživanja su pokazali da nema razlika u koncentraciji fekalne elastaze između pacijenata s dijagnozom IBD-a i pacijenata s ostalim gastrointestinalnim poremećajima. Bolesnici s dijagnozom IBD-a imali su visoke koncentracije fekalnog kalprotektina u odnosu na skupinu bolesnika koji nemaju navedeni poremećaj. Snižene koncentracije fekalne elastaze pokazale su slabu korelaciju s povišenim koncentracijama fekalnog kalprotektina kod pacijenata s dijagnozom aktivnog IBD-a. Fekalni kalprotektin ima značajan dijagnostički potencijal te može s visokom dijagnostičkom osjetljivošću (87,88 %) i specifičnošću (88,46 %) odvojiti pacijente s IBD-om od pacijenata s drugim gastrointestinalnim poremećajima. Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da fekalna elastaza nema dodatnu vrijednost u diferencijalno dijagnostičkom pristupu IBD-a, dok fekalni kalprotektin ima izvrsnu dijagnostičku točnost u otkrivanju IBD-a.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 7 grafičkih prikaza, 9 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, fekalna elastaza, fekalni kalprotektin, insuficijencija pankreasa

Mentori: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*;
dr. sc. Lovorka Đerek, *spec. med. biokem., Klinička Bolnica Dubrava*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *redovna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Dr. sc. Lovorka Đerek, *spec. med. biokem., Klinička Bolnica Dubrava*

Rad prihvaćen: srpanj, 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Analysis of fecal elastase and fecal calprotectin results in patients with and without inflammatory bowel disease

Ana Rukavina

SUMMARY

Inflammatory bowel disease (IBD), ulcerative colitis and Crohn's disease, are complex chronic inflammatory disorders that affect different parts of the gastrointestinal tract mucosa, with continuous changes in the state of remission and relapse. Most of the clinical symptoms are not specific to IBD and can occur in other inflammatory diseases. Pancreatic exocrine insufficiency can appear as a result of numerous disorders, and often as an extraintestinal manifestation of inflammatory bowel diseases. Fecal elastase is a pancreatic enzyme that is not degraded when passing through the intestines and correlates with the exocrine function of the pancreas. Fecal calprotectin is a protein that participates in the stimulation of the inflammatory response, and its concentrations in feces are an indirect measure of the neutrophil infiltrate in the intestinal mucosa. The aim of this work was to analyze the results of fecal elastase and fecal calprotectin in order to examine their potential in differentiating gastrointestinal disorders depending on the presence or absence of IBD. Subjects were divided into two groups (the first included patients with a diagnosis of IBD, and the second included patients with gastrointestinal diseases without IBD). From the remaining extracted stool samples of 59 subjects, the concentrations of fecal elastase and fecal calprotectin were determined by immunoturbidimetric methods on the analytical system Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA). The research results showed that there were no differences in fecal elastase concentrations between patients with a diagnosis of IBD and patients with other gastrointestinal disorders. Patients with a diagnosis of IBD had high concentrations of fecal calprotectin compared to the group of patients without the mentioned disorder. Decreased fecal elastase concentrations showed a weak correlation with elevated fecal calprotectin concentrations in patients diagnosed with active IBD. Fecal calprotectin has significant diagnostic potential and can distinguish patients with IBD from patients with other gastrointestinal disorders with high sensitivity (87.88%) and specificity (88.46%). Based on the obtained results, it is concluded that fecal elastase has no additional value in the differential diagnostic approach of IBD, while fecal calprotectin has excellent diagnostic accuracy in detecting IBD.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 7 figures, 9 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: inflammatory bowel disease, fecal elastase, fecal calprotectin, pancreatic insufficiency

Mentors: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry; **Lovorka Đerek, Ph.D.** *European Specialist in Laboratory Medicine*, Clinical Hospital Dubrava.

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Đerek, Ph.D. *European Specialist in Laboratory Medicine*, Clinical Hospital Dubrava

The thesis was accepted: July 2023.