

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Lek. med. Dorota Roszak

**Ocena diagnostyczno-prognostyczna wybranych markerów
zapalnych, flory bakteryjnej i predyspozycji genetycznych
w nieswoistych chorobach zapalnych jelit u dzieci**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. zw. dr hab. Wojciech Cichy

**I Katedra Pediatrii, Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób
Metabolicznych UM im. Karola Marcinkowskiego**

Poznań 2012

Panu Profesorowi Wojciechowi Cichemu
składam serdeczne podziękowanie
za umożliwienie mi zatrzymania się nad fragmentem tajemnicy wiedzy,
za wsparcie, towarzyszenie
oraz życzliwość, zrozumienie i nieocenioną pomoc.

Niniejszą rozprawę dedykuję
Rodzicom,
siostrze Karolinie
oraz tym wszystkim moim bliskim,
którzy życzliwie mi pomagali, doradzali,
dodawali otuchy
i nieustannie dbali o siłę motywacji.

Dziękuję Wam

Spis treści

I. Wstęp	6
II. Cele pracy	29
III. Materiał i Metody	31
1. Pacjenci	31
2. Oznaczanie poziomów markerów stanu zapalnego jelit w kale	34
3. Jakościowe i ilościowe badanie bakterii i grzybów w kale	37
4. Analiza genetyczna	39
5. Analiza statystyczna	43
IV. Wyniki	44
1. Grupa badana	44
2. Poziomy markerów stanu zapalnego jelit	46
Podsumowanie wyników markerów stanu zapalnego jelit	82
3. Wybrane grupy mikroorganizmów jelitowych	84
Podsumowanie wyników badań mikrobiologicznych i grzybów	115
4. Częstość występowania wybranych polimorfizmów genu <i>NOD2/CARD15</i>	117
Podsumowanie wyników polimorfizmów genu <i>NOD2/CARD15</i>	121
V. Dyskusja	123
VI. Wnioski	156
VII. Streszczenie	158
VIII. Summary	166
IX. Piśmiennictwo	174
X. Aneks	199

Objaśnienia skrótów

SKRÓT	OPIS (JEDNOSTKA)
Ch.L-C (CD)	Choroba Leśniowskiego-Crohna (ang.: Crohn Diseases)
w.z.j.g (CU)	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang.: Colitis ulcerosa)
NZJ/IBD	Nieswoiste zapalenia jelit (ang.: Inflammatory Bowel Disease)
IC	Nieokreślone zapalenie jelita grubego(ang.:Colitis indeterminata)
KT	Tomografia komputerowa
NMR	Rezonans magnetyczny
OB	Odczyn Biernackiego
CRP	Białko C-reaktywne
Hgb	Hemoglobina
Fe	Poziom żelaza
ALBU	Stężenie albumin
ASCA	Przeciwciała przeciwko oligomannozowym elementom ściany komórkowej grzybów <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ang.: anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antibodies – ASCA).
ANCA	Przeciwciała przeciwko ziarnistościom cytoplazmy neutrofilów (ang.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies-ANCA)
M2-PK	Dimerowa forma kinazy pirogronianowej
M1-PK	Tetramerowa forma kinazy pirogronianowej
MAM	Microflora – associated mucosa
MDP	Bioaktywny-dipeptyd muramyłowy
<i>NOD2</i>	(ang.: Nucleotide oligomerization domain 2)
<i>CARD15</i>	(ang.:Caspase activation and recruitment domain 15)
TNF-alfa	Czynnik martwicy guza (ang.: Tumor Necrosis Factor)
FC	Kalprotektyna

LF	Laktoferyna
PBS	Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
ECCO	European Crohn's and Colitis Organization
PCDAI	Indeks aktywności choroby Leśniowskiego – Crohna w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego (ang.: Peadiatric Crohn's Disease Activity Index)
CFU	Jednostka tworząca kolonię (ang. Colony Forming Unit)

Rozprawa doktorska wykonana została w ramach projektu badawczego promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 4248/B/P01/2010/38.

I. Wstęp

1. Nieswoiste choroby zapalne jelit

1.1. Charakterystyka choroby

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ, IBD ang.: inflammatory bowel diseases) stanowią grupę chorób charakteryzujących się przewlekłym stanem zapalnym przewodu pokarmowego. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu patogenezy tych chorób ich etiologia nadal pozostaje niejasna.

Najczęściej wyróżnia się dwie jednostki kliniczne: choroba Leśniowskiego-Crohna (CD, ang.: Crohn's disease, Morbus Crohn) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC, ang.: ulcerative colitis). CD i UC mają szeroki zakres manifestacji klinicznych, a ich heterogenność była podkreślana w wynikach badań epidemiologicznych, które koncentrowały się na identyfikacji podgrup lub fenotypów tych jednostek chorobowych.

Choroba Leśniowskiego – Crohna CD swoją nazwę wywodzi od dwóch badaczy: Antoniego Leśniowskiego oraz Burrilla Bernarda Crohna. A. Leśniowski (1867 – 1940) był Polakiem, chirurgiem, od 1919 roku profesorem na Uniwersytecie Warszawskim. Domeną jego zainteresowań była chirurgia dróg moczowych i przewodu pokarmowego (1904 rok opis choroby) (218). W anglojęzycznym piśmiennictwie medycznym, jednostka ta jest opisywana jako Crohn's disease - Morbus Crohn (CD), co wynika z rozgłosu jaki uzyskał artykuł napisany przez Crohna, Ginzburga i Oppenheimera w 1932 roku. Autorzy opisali w nim 14 przypadków, charakteryzując chorobę jako „Terminal ileitis: nowa jednostka kliniczna”, w publikacji użyto nazwy „Regional ileitis”. B.B. Crohn (1884–1983) w 1935 r. został wybrany przewodniczącym Amerykańskiego Towarzystwa Gastroenterologicznego (123).

Okolo 10-15% pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit nie spełnia kryteriów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego lub choroby Leśniowskiego-Crohna. Przypadki te kwalifikowane są, jako zapalenie jelit nieokreślone (ang.: colitis indeterminata (IC) (12,279). Do nieswoistych zapaleń jelit zaliczamy również sporadycznie występujące jednostki chorobowe, takie jak: choroba Behceta, kolagenowe zapalenie jelita grubego, mikroskopowe zapalenie jelit oraz eozynofilowe zapalenie jelit. W przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna przewlekły proces zapalny może być zlokalizowany w każdym odcinku przewodu pokarmowego oraz obejmować całą grubość ściany jelita. W colitis ulcerosa z kolei zajęta jest przede wszystkim błona śluzowa i podśluzowa jelita grubego. Obie

jednostki chorobowe różnią się odmienną lokalizacją i wielkością obszaru w obrębie przewodu pokarmowego zajmowanego przez chorobę. Występują też różnice w obrazie klinicznym, wynikach badań dodatkowych oraz odmiennym charakterze powikłań. Przebieg oraz stopień aktywności choroby są zależne od wielu czynników takich jak: wpływ środowiska, cechy genetyczne, zmiany w ekosystemie jelitowym i układzie immunologicznym.

Doświadczenia kliniczne wykazują, iż przebieg choroby w przypadku dzieci ma częstokroć cięższy przebieg aniżeli u dorosłych. Istotny jest również fakt iż przebieg choroby u pacjentów pediatrycznych i dorosłych różni się fenotypowo (15,48,93). Ponadto przewlekły charakter choroby oraz intensywne długotrwałe leczenie wywierają niekorzystny wpływ na rozwój fizyczny i psychospołeczny dziecka. Dzięki szybkiej diagnozie oraz wdrożeniu odpowiedniego leczenia można obecnie osiągnąć oczekiwany efekt terapeutyczny - poprawę stanu ogólnego pacjenta oraz eliminację lub redukcję ryzyka wystąpienia opóźnienia rozwoju fizycznego (niedobór masy ciała, wzrostu, opóźnienie dojrzewania płciowego). (17,150,160,167,219,220,280)

Poprawne rozpoznanie może być opóźnione z powodu braku specyficznych objawów we wczesnych stadiach choroby. Nieswoiste choroby zapalne jelit najczęściej manifestują się objawami ze strony przewodu pokarmowego, takimi jak: bóle brzucha o różnym nasileniu i lokalizacji, biegunka (stolce z ropą i/lub krwią), nudności, wzdęcie, uczucie pełności, wymioty, zmiany okołoodbytnicze. Ponadto mogą występować objawy ogólnoustrojowe, w postaci niedoboru lub braku przyrostu masy ciała lub spadek masy ciała związany z zaburzeniami wchłaniania i biegunką. Obserwuje się też zahamowanie wzrastania, niewyjaśnione stany gorączkowe, osłabienie, wyczerpanie, częstokroć będące pierwszymi objawami, z jakim pacjent zgłasza się do lekarza. Dla nieswoistych zapaleń jelit charakterystyczne są również objawy spoza przewodu pokarmowego: bóle stawowe, zapalenie stawów, bóle mięśniowe, zmiany skórne, zmiany w okolicy jamy ustnej, choroby nerek, zmiany oczne, choroby wątroby i dróg żółciowych. Choroba może prowadzić do uciążliwych i często stanowiących zagrożenie dla życia powikłań, takich jak: krwotoki z przewodu pokarmowego, niedrożność, perforacje, ropień, przetoki oraz megacolon toxicum. Dla przebiegu choroby charakterystyczne są epizody zaostrzeń i remisji. Odpowiednio dobrane leczenie winno zapewnić spodziewany efekt terapeutyczny w postaci możliwie najdłuższego okresu remisji i zminimalizowania stanów zaostrzeń (ekspresji zaostrzeń).

Konieczne jest więc dobranie celowanej terapii w możliwie krótkim odstępie czasu, co jest osiągalne dzięki nowym metodom diagnostycznym oraz określeniu stopnia aktywności procesu chorobowego. Nadal jednak ograniczeniem procesu diagnostycznego nieswoistych chorób zapalnych jelit jest wysoka inwazyjność oraz cena zalecanych przez gremia specjalistów światowych, metod badawczych (214,223,239).

Epidemiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Badania epidemiologiczne przeprowadzone w drugiej połowie dwudziestego wieku ujawniły, że częstość występowania nieswoistych zapaleń jelit różni się w zależności od lokalizacji geograficznej i pochodzenia rasowego lub etnicznego populacji (116). Na półkuli północnej istnieje gradient częstości występowania choroby między północą i południem, z najwyższymi wskaźnikami w Skandynawii - Dania (nowe zachorowania 4,1/100000), Wielkiej Brytanii (nowe zachorowania 5,9/100000) i Kanadzie (nowe zachorowania 14,3/100000 (19,189). Nieswoiste zapalenia jelit występują najczęściej u mieszkańców Europy Zachodniej i w Ameryce Północnej, rzadziej wśród mieszkańców Azji, Afryki i Ameryki Południowej (6,134,135,217,224,236,291). Częstość występowania choroby Crohna na 100000 przedstawicieli określonej populacji w USA wynosiła: dla rasy białej 43,6, dla Afroamerykanów 29,8, dla Latynosów 4,1 i 5,5 wśród Azjatów (119). Pośród grup etnicznych Żydzi w USA mieli największe ryzyko wystąpienia IBD w porównaniu do białej populacji pochodzenia nieżydowskiego (2. do 4. razy wyższa zachorowalność i 2. do 9-krotnie częstsze występowanie choroby) (233,304).

Większą częstość CD stwierdza się w krajach wysokoprzemysłowych, w społecznościach o wyższym statusie socjoekonomicznym w porównaniu z regionami rolniczymi (200). Częstość występowania choroby wzrasta, gdy populacja migruje z regionu geograficznego o niższym ryzyku zachorowania do obszaru o wyższym ryzyku (6, 7).

W USA i większości krajów zachodnich w ciągu ostatnich kilku dekad stwierdzono wzrost wskaźników epidemiologicznych dotyczących CD. Roczna częstość CD w USA wzrosła od 2. przypadków/100000 w latach 1940 - 1950 do około 7. przypadków/100000 w latach osiemdziesiątych i wczesnych dziewięćdziesiątych (169). Wzrost częstości nowych zachorowań, poprawa opieki medycznej (m. in.: postęp diagnostyki i terapii) spowodowały zmniejszenie śmiertelności, a w konsekwencji zwiększenie częstości występowania choroby z 60 do 133 przypadków na 100000 mieszkańców w okresie między 1980 i 1991 (169).

CD może ujawniać się w każdym wieku, szczyt zachorowań przypada jednak na lata między 15. i 30. rokiem życia. Zaobserwowano znaczący spadek średniej wieku w momencie diagnozy z około 44. lat w 1940 roku do poniżej 30. lat w 1993 roku (169). Skutkuje to zwiększeniem liczby zachorowań na CD w grupie pacjentów pediatrycznych. Przed rokiem 1954 CD u dzieci rozpoznawano rzadko, jednak już w 1990 roku 17% chorych z CD było w wieku poniżej 20 lat (169).

Częstość występowania CD u dzieci w krajach rozwiniętych wzrasta (3). Potwierdziły to doniesienia ze Szkocji, gdzie roczna zachorowalność poniżej 16 lat wzrosła z 1,9/100000 w latach 1981-1983 do 3,0/100000 w latach 1990-1992 (9). Największy wzrost zaobserwowano w grupie wiekowej 12-16 lat, w której częstość podwoiła się z 3,5 do 6,8. W badaniach przeprowadzonych wśród dzieci w Szwecji w latach 1990-2001 stwierdzono, że nowe zachorowania na CD w grupie wiekowej od 0-15 lat wynoszą 4,9/100000/rok (106). Badania wykonane w Danii w latach 1998-2000, wykazały, że częstość nowych zachorowań na CD u dzieci poniżej 15. roku życia wynosi 2,3/100000/rok. Średnie roczne występowanie CD dla dzieci poniżej 15 roku życia wynosiło 6,7 (290). W retrospektywnych badaniach populacji dziecięcej (poniżej 16 roku życia) w Australii w latach 1971-2001 zidentyfikowano 351. dzieci z CD. W ciągu trzech dekad liczba nowych zachorowań na CD wzrosła z 0,128 do 2,0/100000/rok (213). W jednym z najnowszych badań epidemiologicznych dotyczącym występowania IBD u dzieci wykonanym w USA, w populacji stanu Wisconsin nowe zachorowania na CD stwierdzono u 4,56/100000. W 89% nowe przypadki IBD diagnozowano bez uprzedniego związku z zachorowaniami na IBD w rodzinie (153).

Opracowania naukowe wykazują, że zachorowalność na colitis ulcerosa jest względnie stabilna i wynosi ok. od 1,5 do 10 osób na 100000 ludności. W ciągu ostatnich lat obserwowany jest natomiast wzrost liczby zachorowań na chorobę Leśniowskiego – Crohna. W chwili obecnej częstość zachorowań szacowana jest na ok. 9,5 - 12,6 osób na 100 000 ludności (117,118,119,246). W 6-7% przypadków choroba występuje rodzinnie. W ostatnich latach zaobserwowano tendencje do wzrostu zachorowalności na IBD w populacji pediatrycznej, która stanowi około 30% wszystkich chorych z nieswoistym zapaleniem jelit (160,224,306). Z badań wynika, iż w Europie występowanie choroby szacuje się pomiędzy 2 a 6 na 100 000 dzieci i młodzieży (18,117,119,158,291,295,296), natomiast w Polsce zachorowalność w latach 2002-2004 wynosiła 1,22 na 100 000 przypadków (135).

Iwańczak i wsp. (117,118,119) opublikowali wyniki badań oceniających częstość zachorowań na IBD dzieci w Polsce (województwa dolnośląskie i opolskie) w latach 1998-2000. Analizą objęto 73. dzieci w wieku 2,5. do 18. roku życia, w tym 61. dzieci z rozpoznaniem UC i 12. dzieci z rozpoznaniem CD. Stwierdzono, że 6. krotnie częściej chorowały dzieci na UC niż CD. W wieku 0-19 lat zachorowalność na UC wynosiła 2,28/100000, a na CD 0,38/100000 w tym przedziale wieku. Najczęściej chorowały dzieci w wieku 10 do 15 lat (1117,118). Badania ogólnopolskie przeprowadzone w latach 2002-2004 przez Karolewską-Bochenek i wsp. wykazały zapadalność dzieci na nieswoiste zapalenia jelit wynoszącą 2,7/100 tys. dzieci/rok. Zapadalność na CU wynosiła 1,3; na CD – 0,6 oraz na CI 0,8/100 tys. dzieci/rok. Szczyt zachorowań dzieci przypadał na wiek 11-17 lat. Należy poczynić dwie uwagi: zapadalność na NZJ w Polsce jest obecnie niższa niż w krajach Europy Zachodniej, Skandynawii i Ameryce Północnej to jednak liczba chorych stale wzrasta i NZJ występują w coraz młodszym wieku (wg 119).

Etiologia choroby

Etiologia choroby Leśniowskiego-Crohna jest złożona. Aktualnie przyjmuje się, że choroba rozwija się pod wpływem negatywnych uwarunkowań środowiskowych (w tym środowiska wewnętrznego – mikrobiota) i genetycznych (248). Udział czynników środowiskowych w jej inicjacji wydaje się bezsporny. Potwierdzają to badania nad populacjami migrującymi. Jayanthi i wsp. (1992) w oparciu o analizę populacji migrującej z Kaukazu i Południowej Azji do Wielkiej Brytanii (emigracja w młodym wieku) w dwóch przedziałach czasu - lata 70. i 80. XX wieku i analizę częstości występowania w tej grupie CD potwierdzili udział czynników środowiskowych (124).

Różnice w częstości występowania choroby oraz dane wskazujące na jej istotny wzrost w ostatnich kilku dziesięcioleciach w niektórych krajach, mogą wskazywać na odmienności regionalne i populacyjne w ekspozycji na czynniki środowiskowe i/lub genetyczne (116,236). Duże znaczenie mogą mieć: ekspozycja na infekcje, zwyczaje dietetyczne, praktyki higieniczne, stosowane leki oraz szczepienia ochronne (3). Szybki wzrost wskaźników epidemiologicznych CD w krótkim okresie czasu po II Wojnie Światowej może być efektem ekspozycji na czynniki infekcyjne (236).

Badania wykonane w Szwecji sugerowały, że zwiększone ryzyko CD może być związane z infekcjami w okresie prenatalnym, zwłaszcza z zakażeniem wirusem odry (68,69,70). Teorii tej nie potwierdziły badania wykonane w Wielkiej Brytanii, w których nie znaleziono związku między zachorowaniem na odrę, ani żadnym innym zakażeniem w okresie ciąży a zwiększonym ryzykiem wystąpienia CD (69,70,100,187,193,205,282,283). W kilku pracach zwracano również uwagę na zwiększone ryzyko choroby u dzieci, które we wczesnym dzieciństwie przebyły nawracające infekcje dróg oddechowych i zapalenia gardła (68, 87, 302). Jednakże inne badanie nie potwierdziło tych doniesień (29).

W wielu pracach podnoszono rolę bakterii (m. in. *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Chlamydia*) wywołujących infekcje jelitowe, bezpośrednio uszkadzających błonę śluzową. Wykazywano również pośredni udział toksyn oraz innych drobnoustrojów (wirusy Herpes, Rota, odry) i grzybów w inicjacji CD (40,91,109,129,134,191,207). U chorych z CD w badaniach mikrobiologicznych stolca stwierdzano obecność *Strongyloides stercoralis* i *Blastocystis hominis* (76,191). Elliott i wsp. (72) odkryli, że infestacja tasiemcami (powszechna wśród dzieci w krajach rozwijających się) zmniejsza ryzyko wystąpienia CD, ponieważ infestacja ta modyfikuje reakcje immunologiczne wywołane przez bakterie i wirusy (289). Genet i wsp. (84) oraz Duggan i wsp. (66) sugerowali, że stosowanie ciepłej wody i oddzielnej łazienki we wczesnym dzieciństwie może zwiększać ryzyko CD w późniejszym życiu, co oznacza, że lepsze warunki higieniczne w dzieciństwie mogą predysponować do CD. Analizowano również wpływ karmienia piersią, stosowanych szczepień ochronnych i usunięcia wyrostka robaczkowego jako potencjalnych czynników mogących mieć związek z CD, jednak nie uzyskano potwierdzających wyników (43,66,71,84,87,283). Zwraca się uwagę, że przyczyną choroby może być stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych i zażywanie doustnych środków antykoncepcyjnych (4,65,228).

Potencjalnym źródłem choroby mogą być składniki żywienia. Potwierdzono, że dieta bogata w węglowodany (powszechna w krajach wysokorozwiniętych, o dużej zapadalności na CD) może zwiększać ryzyko choroby Crohna (16,54). Wiele antygenów białkowych, z którym spotykają się komórki błony śluzowej jelit może inicjować lub modyfikować reakcje immunologiczne zachodzące w CD (35,121). Amre i Seidman (3) w 2003 roku wysunęli hipotezę, że podatność na CD zależna jest od obecności wariantów DNA

w enzymach metabolizujących ksenobiotyki (XME), co stanowi o ryzyku związanym ze spożywaniem kwasów tłuszczowych, warzyw i owoców (3).

Spośród czynników środowiskowych, w tym także rodzinnych (162,181,236) mających wpływ na rozwój CD, istotnym wydaje się być palenie tytoniu lub ekspozycja na dym tytoniowy. Wpływ nikotyny na ekspresję choroby potwierdził się w badaniach rodzin z IBD. W kohorcie europejskiej, w rodzinach z CD częstość palenia tytoniu wynosiła 64% (241). Palący czynnie i biernie mają większe ryzyko zachorowania na CD, niż niepalący i osoby nieekspozowane na dym tytoniowy (36,241).

Pewne znaczenie w rozwoju CD przypisuje się czynnikom psychogennym (33). Podkreśla się rolę stresu lub podatnej na chorobę psychiki „nadwrażliwej i ksobnej”. Stres może odgrywać rolę „mechanizmu spustowego”. Może być źródłem zmian w przewodnictwie nerwowym, układzie endokrynnym oraz modyfikować odpowiedź immunologiczną (190,227). Istotna wydaje się możliwość powiązania funkcjonalnego i czynnościowego neurotransmiterów i neuromodulatorów oraz ich receptorów, które są wspólne dla przewodu pokarmowego i układu nerwowego. Istnieje przypuszczenie, że neuropeptydy (obecne również w tkance limfatycznej błon śluzowych) mogą odwracać fenotyp Th1 lub Th2, co modyfikuje przebieg reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej (22,226).

W oparciu o powyżej przedstawione rozważania stwierdzić możemy sumarycznie, że na obecnym stanie wiedzy choroba Leśniowskiego-Crohna (ang.: Crohn Diseases; CD) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang.: Colitis ulcerosa: CU) określane, jako nieswoiste zapalenia jelit (NZJ, ang.: Inflammatory Bowel Diseases: IBD) to choroby, których etiologia nie została jeszcze dostatecznie poznana. Rozważa się rolę czynnika bakteryjnego, nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu immunologicznego oraz uwarunkowania genetyczne. Za rolę czynnika genetycznego przemawia zwiększone ryzyko wystąpienie choroby u osób spokrewnionych oraz uwarunkowania rasowe (rasa biała, Żydzi Aszkenazyjscy). Oznaczono już kilka loci kilku genów podatności na nieswoiste choroby zapalne jelit. Prawdopodobnie równy udział w rozwoju choroby odgrywają czynniki immunologiczne oraz mikrobiologiczne. Uważa się, iż u osoby o genetycznie zdeterminowanej wrażliwości ma miejsce reakcja układu immunologicznego w stosunku do mikroorganizmów własnych (autochtonicznych) gospodarza (256) .

1.2 Diagnostyka

1.2.1 Badania endoskopowe

Badanie endoskopowe odgrywa istotną rolę w procesie diagnostycznym nieswoistych zapaleń jelit. Stanowi istotny element diagnostyki różnicowej oraz oceny nasilenia procesu chorobowego, jak również podstawę profilaktyki onkologicznej. Do badań endoskopowych zaliczamy następujące metody:

- gastroscopia - służąca do oceny górnego odcinka przewodu pokarmowego
- kolonoskopia - przeznaczona do oceny jelita grubego, zastawki Bauhina oraz dystalnego odcinka jelita krętego
- enteroskopia jedno i dwu-balonowa - badanie obejmuje możliwie cały odcinek jelita cienkiego.

Odrębny element endoskopii stanowi endoskopia kapsułkowa, której zaletą jest możliwość oceny śluzówki całego przewodu pokarmowego oraz mały dyskomfort dla pacjenta, natomiast wadą niemożność pobrania wycinków do badania histopatologicznego. Właściwe rozpoznanie jest bardzo istotne z uwagi na różnicę w farmakoterapii oraz postępowaniu chirurgicznym pomiędzy jednostkami chorobowymi z grupy NZJ. Postępowanie takie zmniejsza istotnie ryzyko bądź opóźnia występowanie powikłań. W pierwszych stadiach choroby proces diagnostyki różnicowej jest utrudniony z uwagi na podobny obraz kliniczny obydwu jednostek tj. CU i CD (279). Badanie endoskopowe w połączeniu z badaniem histologicznym stanowi podstawowy element procesu diagnostycznego, oceny zasięgu i nasilenia procesu zapalnego oraz wykrywania i leczenia powikłań. Z doniesień naukowych wynika, że w przypadku 7-10% pacjentów nie udaje się postawić ostatecznego rozpoznania na podstawie badania endoskopowego oraz, że aż w 9% o przebiegu ciężkim i 2,5% o lekkim przebiegu choroby uzyskane rozpoznanie jest nieprawidłowe (211). Ponadto w okresie 1-2 letniej obserwacji, u około 10 % pacjentów konieczna okaże się zmiana rozpoznania (188). Badanie endoskopowe umożliwia ocenę zasięgu choroby, co jest szczególnie istotne w przebiegu colitis ulcerosa, z uwagi na zwiększone ryzyko wystąpienia raka jelita w tej grupie pacjentów. Kolonoskopia w połączeniu z badaniem histologicznym umożliwia określenie ryzyka wystąpienia procesu nowotworzenia oraz ustalenie trybu nadzoru onkologicznego. Diagnostyka endoskopowa odgrywa znaczącą rolę w procesie klasyfikacji oraz zaplanowania leczenia chirurgicznego.

Poszerzenie diagnostyki endoskopowej o chromoendoskopię pozwala na zbliżoną do badania histopatologicznego ocenę zasięgu procesu zapalnego (32,139,204). Badanie endoskopowe odgrywa więc istotną rolę w procesie rozpoznawania, różnicowania, wykrywania i leczenia powikłań choroby oraz w ocenie skuteczności terapii. Należy jednak pamiętać o dużej inwazyjności tej metody diagnostycznej, co w połączeniu z wysokim kosztem ogranicza dostępność badania, zwłaszcza w przypadku pacjentów pediatrycznych (zbyt mała liczba atestowanych pediatrycznych pracowni endoskopowych w kraju).

1.2.2 Badania obrazowe

Badania obrazowe stanowią istotny element diagnostyki, oceny stopnia zaawansowania choroby oraz reakcji organizmu na leczenie w przypadku nieswoistych chorób zapalnych jelit. Do diagnostyki obrazowej zaliczamy między innymi: ultrasonografię jamy brzusznej, ultrasonografię jamy brzusznej z Dopplerem, pasaż przewodu pokarmowego rtg, wlew kontrastowy rtg, enteroklyzę KT oraz enterografię NMR. (81).

1.2.3 Badania laboratoryjne

a) Klasyczne badania laboratoryjne

Odczyn Biernackiego (OB) jest jednym z najstarszych, a zarazem najtańszych badań laboratoryjnych, używanych rutynowo w praktyce lekarskiej. Parametr ten służy do oceny i wystąpienia stopnia nasilenia procesu zapalnego. Wadą badania jest niska specyficzność i czułość. Dzięki niewielkiemu kosztowi i dużej dostępności jest używany do oceny aktywności procesu zapalnego towarzyszącego wielu chorobom w tym NZJ.

Nowszym badaniem służącym do oceny nasilenia procesu zapalnego jest białko ostrej fazy, glikoproteina, zwana białkiem C-reaktywnym (CRP), które charakteryzuje się małą swoistością, ale dużą czułością. Jednym z typowych objawów nieswoistych zapaleń jelit jest krwawienie z przewodu pokarmowego, mogące mieć charakter przewlekły lub ostry. Z tego względu podstawowym badaniem służącym do weryfikacji rozpoznania i oceny aktywności choroby jest morfologiczna ocena elementów komórkowych krwi wraz z stężeniem żelaza w surowicy. Niedobór masy ciała, niedobory w odżywieniu oraz zaburzone wchłanianie substancji odżywczych mogą prowadzić do niedoborów białka oraz spadku stężenia albumin w surowicy krwi. Wspomniane parametry są istotnym wskaźnikiem w ocenie nasilenia procesu chorobowego w NZJ. W wielu publikacjach przedstawiono korelację pomiędzy

parametrami laboratoryjnymi (OB., CRP, hemoglobina, płytki krwi, żelazo, albuminy), a kliniczną aktywnością choroby (141).

Istotnym elementem w procesie diagnostyki nieswoistych chorób zapalnych jelit są badania serologiczne. Najczęściej stosowanymi w praktyce lekarskiej markerami są przeciwciała skierowane przeciwko ziarnistościom cytoplazmy neutrofilów (ang.: anti-neutrophil cytoplasmic antibodies-ANCA) oraz przeciwciała przeciwko oligomannozowym elementom ściany komórkowej grzybów *Saccharomyces cerevisiae* (ang.: anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies – ASCA). Badanie serologiczne jest pomocne w procesie różnicowania, gdyż przeciwciała pANCA występują w 60-80% u chorych z colitis ulcerosa, natomiast tylko w 25% przypadkach choroby Leśniowskiego - Crohna. Z kolei przeciwciała ASCA są spotykane w 45-76% pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna, w przeciwieństwie do colitis ulcerosa, gdzie występują zaledwie w około 5%. Dzięki znacznej różnicy w występowaniu w/w przeciwciał w obu grupach chorych uzyskano wzrost swoistości związany ze spadkiem czułości tej metody diagnostycznej (215,234).

b) Nowe badania laboratoryjne - markery stanu zapalnego.

Diagnostyka, zarówno typu nieswoistej choroby zapalnej jelit jak i stanu aktywności choroby, jest wysoce specjalistyczna, zaś jej wyniki mogą być niekiedy problematyczne w interpretacji. Stan kliniczny pacjenta często nie odpowiada stopniowi zaawansowania procesu chorobowego, który oceniany jest np. markerami procesu zapalnego. Stosowane obecnie standardowo inne metody diagnostyczne, takie jak techniki endoskopowe, histopatologiczne czy radiologiczne są inwazyjne i kosztowne. Natomiast u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit konieczne jest systematyczne i wielokrotne wykonywanie kierunkowych, nieinwazyjnych badań laboratoryjnych, zwłaszcza przed planowanymi modyfikacjami procesu terapeutycznego.

Z uwagi na opisane powyżej problemy, koniecznością staje się opracowanie nowych, nieinwazyjnych i nieobciążających pacjenta metod oceny zmian zapalnych w jelitach. Z tego względu rośnie zainteresowanie różnymi nowymi markerami stanu zapalnego. Markery zapalne towarzyszą określonym zmianom w organizmie. Ze zróżnicowaną czułością i swoistością wskazują na istnienie diagnozowanej choroby. Z licznych publikacji wynika, iż analiza markerów zapalnych w stolcu pacjenta umożliwia najlepsze zobrazowanie zmian zachodzących w obrębie jelit. Za najbardziej przydatne wskaźniki obecności i stopnia

aktywności choroby także u pediatrycznych pacjentów z NZJ uważa się związki wykrywane w kale. Ponadto badacze uważają, iż całkowita remisja kliniczna oraz endoskopowa korelują z normalizacją poziomu markerów biochemicznych (204).

Zaletami diagnostyki bazującej na badaniach markerów w kale są: dostępność, nieinwazyjność, możliwość przeprowadzenia wielokrotnej oceny stopnia zawansowania choroby oraz kontrola skuteczności leczenia. Wahania białek oznaczanych w kale doskonale odzwierciedlają dynamikę procesu zapalnego, przede wszystkim w obrębie jelita, gdyż nie ulegają trawieniu wewnątrzjelitowemu. Kontrowersje budzi jedynie fakt, że większość białek i enzymów będących markerami stanu zapalnego, zostaje uwalniana do kału podczas każdego procesu zapalnego, przebiegającego w obrębie błony śluzowej jelita. W związku z tym markery te są wysoce czułe, ale stosunkowo mało specyficzne. Podwyższenie ich poziomu można wystąpić również w przypadku nietolerancji i alergii pokarmowej, chorobie trzewnej czy chorobach zakaźnych przewodu pokarmowego o etiologii bakteryjnej lub wirusowej. Dobrze opisane jest praktyczne zastosowanie takich markerów jak: kalprotektyna, laktoferyna, alfa-1-antytrypsyna, lizozym, mieloperoksydaza i elastaza granulocytów obojętnochłonnych (51,132,298,299). Najnowsze doniesienia sygnalizują przydatność nowych markerów oznaczanych w stolcu pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, takich jak: białko S100A12 i dimerowa forma kinazy pirogronianowej (42,49,56,146,154,175,176,184,257,288).

Kalprotektyna

Kalprotektyna jest dwujednostkowym kompleksem białek (o masie cząsteczkowej 36 kDa) wiążącym wapń oraz cynk, znajdującym się w ziarnistościach neutrofilii, makrofagach i monocytach. Dzięki wiązaniu jonów cynku kalprotektyna posiada zdolność do działania przeciwdrobnoustrojowego i antyproliferacyjnego. Powszechne jest przekonanie, iż nie wszystkie właściwości jej działania zostały dokładnie poznane. Przydatną w procesie diagnostycznym cechą tego białka jest oporność na działanie bakterii jelitowych (uzyskana dzięki zdolności wiązania jonów wapnia) oraz jego wysoka stabilność (do 7 dni w temperaturze pokojowej). Omawiane białko występuje we wszystkich komórkach ciała, co stanowi zaletę przy wykorzystaniu go, jako markera stanu zapalnego. Bodziec wpływający na zaburzenie homeostazy organizmu aktywuje leukocyty, które w następstwie uwalniają znaczne ilości kalprotektyny. Prowadzi to do wzrostu jej stężenia w płynach ciała oraz kale.

Dzięki temu na podstawie zmiany stężenia kalprotektyny w kale można wnioskować o nasileniu zmian chorobowych w organizmie. Badania dowodzą, że wzrost stężenia kalprotektyny w kale zachodzi w przypadku ostrych stanów zapalnych, takich jak: nieswoiste choroby zapalne, infekcje bakteryjne, ponadto w przypadku polipów i nowotworów jelita. Stężenie omawianego parametru w kale zmienia się wraz z wiekiem: jest wysokie u noworodka, spada w pierwszych dniach życia, lecz pozostaje relatywnie wyższe u małych dzieci niż u dorosłych. W przebiegu choroby typu NZJ dochodzi do „rozszerzenia” bariery jelitowej, a w konsekwencji przenikania leukocytów przez ścianę jelita. Z tego powodu stężenie kalprotektyny jest statystycznie istotnie wyższe u pacjentów z tą jednostką chorobową niż u osób zdrowych. Omawiany marker może być użyty w skrinigu pacjentów z bólami brzucha i biegunką, zwłaszcza w przypadku dzieci, a to z uwagi na niską inwazyjność metody (1). Zmiany stężenia przedstawionego markera umożliwiają różnicowanie zaburzeń czynnościowych od zmian zapalnych przewodu pokarmowego. Większość dostępnych badań naukowych wykazuje wysoką skuteczność oznaczania kalprotektyny w określaniu stopnia aktywności choroby w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. U pacjentów z ostrą postacią choroby, leczonych glikokortykosteroidami, zaobserwowano spadek wartości markera, jednak nie aż do wartości uznanych za fizjologiczne. Może to świadczyć o przydatności tego parametru w ocenie stanu zapalnego w jelicie także w nieaktywnej klinicznie postaci choroby (143). Wymieniony marker może być więc wykorzystany zarówno do oceny stopnia zaostrzenia choroby jak i prognozowania nawrotów choroby w okresie remisji klinicznej. Daje to możliwość modyfikacji procesu terapeutycznego przed wystąpieniem zaostrzenia klinicznego, które nie zawsze koreluje z nasileniem zmian zapalnych w jelicie. Czułość badania z zastosowaniem kalprotektyny oceniono na 95%, swoistość natomiast na 93%. W jednym z doniesień wykazano brak korelacji stężenia kalprotektyny z obecnością choroby Leśniowskiego – Crohna (301). Otwartym pozostaje natomiast problem przydatności kalprotektyny w ocenie aktywności procesu chorobowego w jelitach. Dlatego istnieje uzasadniona potrzeba dokładnego określenia czułości i swoistości tego markera w obrazowaniu zmian szczególnie w grupie pediatrycznych chorych z NZJ.

Laktoferyna

Laktoferyna jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 80 kDa, pełniącą funkcje białka odporności wrodzonej. Zmagazynowana w specyficznych ziarnistościach neutrofilów, posiada zdolność do wiązania jonów żelaza. Bierze ponadto udział w procesach regulacji odporności nabytej oraz zapewnia homeostazę żelaza, wykazuje aktywność antymikrobiologiczną, neutralizuje endotoksyny, działa przeciwzapalnie, przeciwnowotworowo i przeciwbólowo jak również przeciwpasożytniczo i przeciwgrzybiczo. Wpływa na dojrzewanie i różnicowanie limfocytów, mielopoety i regulacji metabolizmu kości i in. Produkcja omawianego białka zachodzi w komórkach nabłonka wydzielniczego. Następnie zostaje ono uwolnione do odpowiednich wydzielin, takich jak: mleko, ślina, łzy, wydzielina pochwy, płyn nasienny. Występuje również w mniejszych ilościach w kale, moczu i płynie mózgowo – rdzeniowym. Zaletą omawianej glikoproteiny jest jej oporność na działanie trawiące enzymów, co pozwala na przejście przez przewód pokarmowy w postaci niestrawionej. Oznaczanie laktoferyny przyjęto za badanie wiarygodne, zwłaszcza ze względu na zbadaną wyjątkową stabilność tego białka. Laktoferyna nie ulega proteolizie przez 48 godzin w temp. do 50°C, ani podczas kilkakrotnego rozmrażania materiału biologicznego. Ponadto opisywany marker jest stabilny w temperaturze pokojowej nawet przez 7 dni (126,136). Jest to szczególnie istotne dla procesu diagnostycznego i umożliwia przechowywanie oraz przesyłanie materiału pocztą. W reakcji na przewlekły stan zapalny dochodzi do degranulacji neutrofilii, czego następstwem jest zwiększenie stężenia glikoproteiny w osoczu, a następnie w surowicy. Zaznaczyć należy, iż stężenia laktoferyny u osób zdrowych jest raczej niski. Dzięki temu omawiane białko może pełnić rolę wartościowego markera stanu zapalnego (13,159).

Próby wykorzystania laktoferyny w diagnostyce podjęto już w latach pięćdziesiątych XX wieku. Silletti i wsp. (260) opisywali wówczas zalety oznaczania stężenia laktoferyny w kale w różnicowaniu biegunki o etiologii bakteryjnej od wirusowej, postulując wykorzystanie tego parametru w diagnostyce ostrych biegunek. Dotychczas przeprowadzone analizy wskazują na zadowalające zastosowanie diagnostyczne laktoferyny, jako wskaźnika stopnia aktywności choroby u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Stężenie białka dobrze koreluje ze stanem klinicznym pacjenta i spada w momencie osiągnięcia remisji. Wiele analiz naukowych wykazało wzrost stężenia laktoferyny w kale u chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit (88,89,132,269). Dostępne są również wyniki

analiz przeprowadzanych u dzieci, świadczące o przydatności omawianego markera (299). Walker i wsp. (126) określili czułość i swoistość opisywanej metody diagnostycznej na odpowiednio 97% i 100% u pacjentów pediatrycznych. Podobne wyniki zostały zaprezentowane przez Joishy i wsp., a w przypadku tego badania czułość wynosiła 91%, zaś swoistość 87,5 %. Aktualny stan wiedzy wskazuje, że oznaczanie stężenia laktoferyny jest przydatnym badaniem w diagnostyce nieswoistych chorób zapalnych jelit, zwłaszcza w pediatrii. Przeprowadzone w Polsce analizy wskazują również na występowanie korelacji pomiędzy nasileniem zmian w badaniu endoskopowym, a stężeniem laktoferyny w kale u dzieci. Czułość i swoistość testu w badanej grupie wynosiły odpowiednio: 78,86% i 92,10% (27,28).

Zarówno kalprotektyna jak i laktoferyna zyskują więc stopniowe uznanie, jako narzędzia skutecznej diagnozy stopnia aktywności choroby u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. Wskazuje się również na celowość jednoczesnego oznaczania obu markerów, co umożliwiłoby osiągnięcie wyższej czułości i swoistości badania.

Dimerowa forma kinazy pirogronianowej M2-PK

Kinaza pirogronianowa to enzym występujący powszechnie w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Bierze udział w procesie glikolizy, jest jednym z podstawowych enzymów szlaku energetycznego komórki (przekształca fosfoenolpirogronian do pirogronianu z jednoczesnym powstaniem ATP). Wydzielana jest w dwóch różnych, tkankowo specyficznych formach (izoenzymy). W mięśniach i mózgu znajduje się forma tetramerowa M1-PK, w wątrobie i nerkach wydzielana jest forma L - PK. W silnie proliferujących komórkach, takich jak np. komórki nowotworowe czy dojrzałe komórki macierzyste dominującą postacią kinazy jest postać dimerowa, zwana M2-PK. Jest to nieaktywna postać izoenzymu, w przeciwieństwie do aktywnej, tetrametrowej formy występującej w zdrowych komórkach. Forma dimerowa M2-PK dominuje nad formą fizjologiczną w zmienionych chorobowo tkankach. Fakt ten sprawia, że oznaczenie aktywności M2-PK wydaje się być skutecznym narzędziem dla wykrywania zmian nowotworowych we wczesnych stadiach, jak również diagnozowania przewlekłych stanów zapalnych (zwłaszcza w badaniach przesiewowych i w diagnostyce różnicowej). Omawiany marker znalazł zastosowanie, jako test skriningowy zdrowej, bezobjawowej populacji w kierunku polipów i raka jelita grubego. Ponadto podwyższone wartości enzymu mogą

wystąpić u pacjentów z obrażeniami wielonarządowymi, przewlekłą niewydolnością serca, guzami przewodu pokarmowego i zapalenie zbiornika kałowego (ang.:pouchitis). M2-PK nie jest ograniczony do konkretnej tkanki, dzięki czemu może być użyty do badania każdego elementu zajętego procesem nowotworowym. Aktywność kinazy pirogronianowej oznaczany jest w osoczu i kale (137). Największą uwagę przyciąga jednak wysoka czułość i swoistość markera kałowego, jako wskaźnika nasilenia zmian zapalnych w jelicie grubym. Wiele analiz potwierdziło przydatność tego oznaczenia w kale, w diagnozowaniu zmian nowotworowych jelita oraz stanów przednowotworowych, czyli polipów i gruczolaków (99,101,137,286,305).

Metaanalizy wykazały, iż ogólna czułość markera wynosi 68,8 – 91 %, natomiast swoistość 71,9 – 100% dla detekcji raka jelita grubego (127). Wykazano w nich także wzrost poziomu czułości oznaczenia wraz ze wzrostem stadium rozwoju nowotworu. Parametr wydaje się również przydatny w identyfikacji chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit oraz dla odróżnienia zmian czynnościowych od organicznych. Wartość M2-PK w kale osoby zdrowej wynosi granicznie 4U/ ml kału. Dotychczasowe analizy wykazują podwyższoną aktywność markera w kale pacjentów dorosłych z zapalną chorobą jelit (42). Wykazano wyraźne podwyższenie aktywności markera u pacjentów z aktywną postacią tej. choroby, w porównaniu z pacjentami w stanie remisji. Niestety, dotychczasowe wyniki badań nie wykazały istotnych statystycznie różnic w wartości markera pomiędzy pacjentami z colitis ulcerosa a chorobą Leśniowskiego-Crohna. Istotnym dla oceny stanu zdrowia pacjenta jest fakt, iż aktywność M2-PK spada wraz z osiągnięciem remisji, co umożliwia ocenę stopnia odpowiedzi pacjenta na terapię oraz jej ewentualną modyfikację. Co istotne, aktywność kinazy pirogronianowej w formie dimerowej nie jest podwyższony u pacjentów z zespołem jelita nadwrażliwego, dzięki czemu możliwe jest nieinwazyjne rozróżnianie zmian czynnościowych od organicznych. Badania wykazały przydatność omawianej metody do zastosowania jej u pacjentów pediatrycznych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. W badaniu Czub i wsp. (49) wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy aktywnością kinazy pirogronianowej w kale u pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna w okresie remisji, a grupą kontrolną. Natomiast u chorych z colitis ulcerosa stwierdzono brak różnicy między pacjentami będącymi w stanie remisji, a grupą kontrolną (49).W opisywanej analizie zaobserwowano korelację aktywności kinazy pirogronianowej, ze stopniem nasilenia klinicznego choroby ocenianego odpowiednimi skalami.

Dotychczas przeprowadzono niewiele analiz z użyciem kinazy pirogronianowej u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit w tym szczególnie dzieci. Z tego powodu uznano za uzasadnione włączenie oznaczeń tego markera do grupy ocenianych parametrów stanu zapalnego dzieci.

2. Czynniki bakteryjne u dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

Do rozwoju nieswoistych zapaleń jelitowych i podtrzymania stanu zapalnego, dochodzi najprawdopodobniej u pacjentów z uwarunkowanym genetycznie defektem układu immunologicznego, w połączeniu z ekspozycją na niekorzystne czynniki środowiskowe. Liczne badania naukowe dowodzą, iż znaczącą, jeśli nie dominującą rolę wśród tych czynników odgrywają drobnoustroje zasiedlające przewód pokarmowy (mikrobiota).

Drobnoustroje bytujące w przewodzie pokarmowym zdrowej osoby, są niezbędne dla utrzymania stanu równowagi mikrobiologicznej w jelitach, jak również homeostazy całego organizmu. Mikrobiota, oprócz syntezy enzymów biorących udział w procesie trawienia, syntetyzują liczne witaminy oraz metabolity o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zachowane proporcje jakościowe i ilościowe mikrobiota zabezpieczają przed namnażaniem mikroorganizmów chorobotwórczych i kolonizacją organizmu. Należy zaznaczyć, iż ogólna liczba drobnoustrojów nie podlega zbyt dużym zmianom przez okres życia. W zależności od wieku, diety, stylu życia, przyjmowanych leków i innych czynników zmienia się natomiast liczebność poszczególnych drobnoustrojów. Zasadniczo jednak liczebność poszczególnych rodzajów drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym jest w miarę stabilna i można określić przedziały liczbowe, stanowiące normę dla zdrowego dziecka jak i dorosłego człowieka. Mikroflora małego dziecka jest w pełni stabilna i odpowiada kompozycji mikrobiota osoby dorosłej już od około 5 roku życia (86,230).

W przypadku pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit stosunki te są zaburzone. Bakterie autochtoniczne traktowane są bowiem przez układ odpornościowy jako szkodliwe antygeny, co za tym idzie dochodzi do nieprawidłowej, przewlekłej aktywacji śluzówkowego układu odpornościowego. Szczególnie w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna drobnoustroje własne gospodarza podejrzewane są o inicjowanie reakcji odpornościowej, prowadzącej do rozwoju stanu zapalnego. Częstokroć w grupie tej obserwuje się dysbiozę przewodu pokarmowego. Z drugiej strony, nieustannie prowadzone są badania mające na celu określenie jednego, konkretnego mikroorganizmu, będącego przyczyną

choroby. Dla opisanie roli mikrobiota w rozwoju nieswoistych zapaleń jelitowych opracowano dwie przeciwstawne teorie (263):

1. konkretnego patogenu, będącego przyczyną rozwoju nieswoistych zapaleń jelit
2. dominujących grup drobnoustrojów u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit

Badania Swidsinskiego i wsp. (271) wykazały wyraźne zaburzenie równowagi bakteryjnej u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Prawdopodobna jest teza o zmianie ilościowej w obrębie mikrobiota i namnożeniu drobnoustrojów potencjalnie patogennych. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna liczebność tych bakterii była istotnie wyższa w odcinkach niezmienionej chorobowo błony śluzowej, w odniesieniu do zmian zapalnych. Być może drobnoustroje te nie są bezpośrednią lub jedyną przyczyną choroby. Wyniki badań eksperymentalnych potwierdziły istotne zmiany w układzie mikroorganizmów jelitowych. Wykazano też odmienny sposób kolonizacji przewodu pokarmowego. U myszy zdrowych bakterie jelitowe występowały na powierzchni śluzu (bez kontaktu z komórkami jelitowymi), u osobników chorych kolonizowały natomiast powierzchnię śluzówki (265).

Nadal nie wyodrębniono konkretnego mikroorganizmu odpowiedzialnego za inicjację stanu zapalnego. Istnieje teza, że w zapoczątkowaniu choroby rolę odgrywają zupełnie inne grupy drobnoustrojów, niż w jej podtrzymaniu. O udział w etiopatogenezie choroby podejrzewa się małe RNA-wirusy oraz zdefektowane lub pozbawione ściany bakterie z rodzaju *Mycobacterium* i *Pseudomonas*, natomiast rolę w ciągłym podtrzymywaniu stanu zapalnego przypisuje się *Clostridium difficile*, określonym szczepom *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia*, *Campylobacter*, *Peptostreptococcus*, *Coprococcus* oraz *Eubacterium* (145).

Wielu badaczy postuluje istotny udział prątka *Mycobacterium paratuberculosis* w rozwoju i podtrzymaniu choroby. Drobnoustrój ten często znajdowany jest w bioptatach błony śluzowej jelita u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wykazano, iż mikroorganizm ten bierze udział w inicjacji charakterystycznej dla bydła choroby Johna, objawowo zbliżonej do choroby Crohna (235).

O udział w rozwoju przewlekłych stanów zapalnych podejrzewa się od dłuższego czasu patogeniczne szczepy *Escherichia coli*, szczególnie *O 157* oraz *H7* (145). Produkty metabolizmu tych bakterii negatywnie wpływają na śluz pokrywający nabłonek jelita oraz krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, mając w konsekwencji istotny udział w rozwoju stanu

zapalnego. Wymienione szczepy *E. coli* często występują w ekosystemie jelitowym w rodzinach z obciążonym wywiadem chorobowym (156,168). Poszukiwanie czynników spustowych choroby obejmuje ponadto analizę bakterii z rodzaju *Bacteroides*. Stanowią one dominującą część ludzkiej mikroflory. Około 30% wszystkich bakterii beztlenowych izolowanych z materiałów klinicznych należy do wskazanego rodzaju. Część gatunków *Bacteroides*, zwłaszcza *Bacteroides fragilis* wykazuje właściwości chorobotwórcze. Otokkowe szczepy *Bacteroides fragilis* mają zdolność do produkcji adhezyny, co ułatwia kolonizację i tworzenie agregatów z innymi drobnoustrojami patogennymi. Z kolei wytwarzanie fragilizyny, umożliwia szczepom hydrolizę wiązania peptydowego kadheryny (białka wchodzącego w skład połączeń ścisłych), co prowadzi w konsekwencji do zwiększenia przepuszczalności nabłonka jelitowego dla toksyn czy innych antygenów na przykład pokarmowych. Analiza autorstwa Kamińskiej i wsp. (129,130) wykazała istotną dominację bakterii z rodzaju *Bacteroides* u dzieci z colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna, zwłaszcza w umiarkowanym i ciężkim przebiegu choroby. W badaniu Andoh i wsp. (5) *Bacteroides vulgatus* okazał się być jedynym gatunkiem wykrytym u wszystkich przebadanych pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna.

O istotną rolę w nieswoistych zapaleniach jelit podejrzewa się również *Clostridium difficile*, zwłaszcza w aspekcie przyczyny nawrotów choroby (274).

Udział czynnika mikrobiologicznego w zapoczątkowaniu (tzw. “czynnik spustowy”) i/lub podtrzymaniu stanu zapalnego jest więc obecnie w świetle wyników opublikowanych badań - bezspornym faktem. Nadal jednak nie określono czy jest on bezpośrednim czynnikiem inicjującym, czy jedynie wtórnie podrażnia błonę śluzową przewodu pokarmowego, podtrzymując stan zapalny. Nadal nie wyizolowano jednego, określonego drobnoustroju, obecnego u wszystkich chorych. Niewątpliwym problemem są istotne różnice w obecności i aktywności czynnika mikrobiologicznego w colitis ulcerosa i chorobie Leśniowskiego-Crohna. Uważa się nawet, iż to w tej ostatniej chorobie drobnoustroje wydają się odgrywać większą rolę, aniżeli we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Fakt ten może sugerować odmienne podłoże obu jednostek chorobowych. Na podkreślenie zasługuje wysoce istotna rola, jaką w przebiegu choroby Leśniowskiego–Crohna wydaje się odgrywać *Faecalibacterium prausnitzii*. Badania Sokol i wsp.(263) wykazały istotną redukcję liczebności *Faecalibacterium prausnitzii* w grupie drobnoustrojów związanych ze śluzówką części krętniczo–kątniczej (ang.: microflora associated mucosa - MAM) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wykazano jednocześnie istotną korelację między redukcją

liczebności tych mikroobów, a zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby w ocenie endoskopowej po 6 miesiącach (263).

W świetle aktualnych badań *Faecalibacterium prausnitzii* wydaje się być kluczowym elementem mikrobiologicznym w zachowaniu homeostazy środowiska jelit. Tezę tą potwierdzają wyniki badań Schwierza i wsp. (253) ukazujące istotną redukcję liczebności *F. prausnitzii* u dzieci z aktywną postacią choroby Leśniowskiego – Crohna i w stanie remisji. U pacjentów z aktywną postacią choroby obserwowano ponadto zwiększoną liczebność *E.coli* (254)

3. Uwarunkowania genetyczne nieswoistych chorób zapalnych jelit

Liczne dowody wskazujące na genetyczne podłoże choroby Leśniowskiego-Crohna, niektóre na rozwój wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (258,262). Zostały one poparte przez dane epidemiologiczne, które obejmują różnice rasowe i etniczne w częstości występowania choroby, badania rodzin i bliźniąt oraz porównania z innymi znanymi zespołami genetycznymi. Badania na zwierzętach również potwierdzają genetyczne uwarunkowanie CD (216).

O roli czynników genetycznych w występowaniu CD świadczyć mogą: (25,216,293) m.in.:

- etniczne zróżnicowanie wskaźników epidemiologicznych choroby Leśniowskiego-Crohna w różnych populacjach,
- zwiększone ryzyko występowania CD wśród krewnych pierwszego stopnia osób dotkniętych chorobą oraz niska częstość występowania choroby wśród współmałżonków,
- zbieżność w rodzaju i lokalizacji choroby wśród członków rodzin z wieloma dotkniętymi chorobą krewnymi,
- badania bliźniąt:
bliźnięta monozygotyczne z CD – współczynnik zgodności: 37-58%,
bliźnięta dizygotyczne z CD – współczynnik zgodności: 0-7%,
- identyfikacja głównych loci podatności przez screening genomu – 2q, 3q, 6p, 16q12 (region *NOD2/CARD15* - związek wyłącznie z CD), 17q, 19p.,

- związek z innymi chorobami z rozpoznaną podatnością genetyczną: zwyrodniające zapalenie stawów kręgosłupa, łuszczyca, wyprysk atopowy, stwardnienie rozsiane (SM), pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, rumień guzowaty, autoimmunologiczne zapalenie wątroby.
- związek ze swoistymi subklinicznymi markerami warunkowanymi genetycznie (przeciwciała przeciwko polisacharydom ściany komórkowej *Saccharomyces cerevisiae* – ASCA).

Również badania na zwierzętach wykazały istotny wpływ czynników genetycznych na występowanie IBD (25,216) za czym przemawiają m.in.:

- przy pomocy technik transgenicznych lub delecji genów uzyskiwano rozwój nieswoistego zapalenia jelit,
- u podatnych gospodarzy bakterie komensalne są niezbędne do rozwoju IBD.

W badaniach populacyjnych u 5 - 11% wszystkich osób dotkniętych chorobą wykazano dodatni wywiad rodzinny, podkreślając, że największym czynnikiem ryzyka zachorowania na IBD jest posiadanie w rodzinie osób chorych (75,153,186,237). Bornholm i wsp. (203) w badaniu kohortowym wykazali względne ryzyko populacyjne wynoszące 14 dla krewnych chorych na CD. Podobne, 14-15-krotnie zwiększone ryzyko stwierdzono dla krewnych pierwszego stopnia w dwóch innych badaniach (209,245). Wykazano, że 75% spośród dotkniętych IBD rodzin prezentuje ten sam typ choroby (np. wszyscy chorzy w rodzinie chorują na CD lub UC) (21). Dane te są zgodne z modelem patogenezy choroby, oceniającym liczne geny podatności, gdzie niektóre geny są wspólne dla CD i UC, a inne wiążą się tylko z jedną z chorób (25).

Obserwacje rodzin najdokładniej wskazują na koincydencję wpływów genetycznych i środowiskowych w patogenezie CD. Potwierdzają to cytowane uprzednio wyniki badań bliźniąt (266,281). Mniejszość chorych z CD ma dodatni wywiad rodzinny (153). Dlatego istotnym jest określenie związku między rodzinnymi i sporadycznymi przypadkami IBD oraz zbadanie czy warianty genetyczne zidentyfikowane w rodzinnych przypadkach CD odgrywają też rolę w patogenezie przypadków sporadycznych, a także czy istnieją cechy kliniczne odróżniające przypadki rodzinne od sporadycznych? Peeters i wsp. (208) sugerują, że rodzinna i sporadyczna CD są różnymi jednostkami chorobowymi, z powodu różnic w

lokalizacji choroby i jej przebiegu w tych grupach. Najbardziej stałą obserwacją różniącą przypadki rodzinne IBD w porównaniu z przypadkami bez udokumentowanej historii rodzinnej był wcześniejszy początek choroby w pierwszej grupie. Dla CD przeciętny wiek w momencie wystąpienia rodzinnego CD wynosi około 22. lata, w porównaniu z 27. latami w przypadkach sporadycznych (244). W porównywaniu rodzinnych i sporadycznych przypadków IBD (zarówno w CD jak i UC) intrygująca jest względna przewaga przypadków żeńskich w rodzinnym IBD.

Wskaźnik kobiety/mężczyźni wynosił między 1.23 i 1.68/1 w rodzinnym CD, co jest wartością wysoką, nawet biorąc pod uwagę nieznaczną przewagę kobiet we wszystkich przypadkach CD. Interesujące jest, że CD o początku w dzieciństwie charakteryzuje się przewagą płci męskiej, więc wysoki współczynnik kobiety/mężczyźni nie jest zgodny z tą obserwacją (ponieważ rodzinne CD występuje raczej w młodszym wieku, niż sporadyczne) (208). Wyniki dotyczące różnej częstości występowania CD w zależności od płci uzyskano dzięki stratyfikacji analizy genetycznej (228,229). Fisher i wsp. (78) w analizie IBD3, w regionie głównego kompleksu zgodności tkankowej na chromosomie 6p wykazali wyraźny związek z płcią męską, zarówno w CD, jak i UC.

Ekspresja okołojądrowych przeciwciał przeciwko polisacharydom ściany komórkowej *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA, ang. antibodies to the cell wall mannan polisaccharide *Saccharomyces cerevisiae*) również wydaje się być cechą rodzin z CD. W chorobie Leśniowskiego-Crohna ASCA są serologicznym markerem dla większości chorych (256). Jednak test na oznaczanie przeciwciał ASCA (50-80% chorych z CD ma wynik pozytywny) nie jest wystarczająco czuły, aby użyć go jako wyłączny test przesiewowy, ponieważ niektóre populacje mają zwiększoną częstość pozytywnych wyników testu ASCA wśród niedotkniętych chorobą krewnych osób z CD (240). Jednoczesne użycie testów z okołojądrowymi przeciwciałami przeciwko cytoplazmie neutrofilii - ANCA (ANCA, ang. antineutrophil cytoplasmic antibodies) i ASCA jest wystarczająco swoiste dla CD lub UC (25).

O tym, jak złożona jest genetyka CD może świadczyć próba powiązania „w działaniu” czynników środowiskowych i genetycznych. W etiologii CD dotychczas nie wyjaśniono ostatecznie m. in. roli czynników: infekcyjnych, dietetycznych, powiązań patogenezy z farmakoterapią i farmakodynamiką leków. Z pewnością wiele reakcji, procesów inicjujących i występujących w przebiegu choroby jest uwarunkowane komponentem genetycznym.

Wpływ w/w czynników na zachodzące w CD reakcje immunologiczne, działanie cytokin, receptorów cytokin, funkcjonowanie komórek odpowiedzi immunologicznej, ich mediatorów, receptorów dla tych mediatorów również regulują swoiste geny. Wyjaśnienie tych uwarunkowań wymaga dalszych badań.

Dane epidemiologiczne oraz badania molekularne wskazują, że wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Leśniowskiego-Crohna są warunkowane wielogenowo. Część loci genetycznych jest wspólna dla obu chorób, część wykazuje związek tylko z jedną z tych chorób. Dotychczas odkryto około 50 genów, których mutacje lub polimorfizmy mają związek z podwyższeniem ryzyka wystąpienia nieswoistych zapaleń jelit. Szacuje się jednak, iż w ciągu najbliższych dwóch lat liczba takich genów wzrośnie przynajmniej dwukrotnie (60,163).

Najlepiej poznanym genem, którego polimorfizmy uznane zostały za czynnik predysponujący do wystąpienia objawów chorobowych choroby Leśniowskiego - Crohna jest *NOD2/CARD15* z loci na chromosomie 16 (110,111,279). Został on przebadany przez trzy niezależne zespoły naukowe (94,95,110,196) i zakwalifikowany, jako element systemu odporności wrodzonej (94,95). Dalsze badania NZJ umożliwiły identyfikację kilkunastu loci genowych związanych ze zwiększoną zachorowalnością na nieswoiste choroby zapalne jelit. Opisano je jako: IBD2 (12,p13), IBD3 (6p13), IBD4 (14q11), IBD5 (5q31-33), IBD6 (19p13), IBD7 (1p) (96,97,98). Rola ich jest słabiej poznana, w przeciwieństwie do IBD1, gdzie zakodowany jest wewnątrzkomórkowy receptor NOD2 (ang.: *nucleotide oligomerization domain2*), nazwany wcześniej CARD 15 (ang.: *caspase activation and recruitment domain 15*), pełniący funkcję wewnątrzkomórkowego receptora dla peptydoglikanu na powierzchni bakterii. NOD2 aktywowany jest przez minimalny składnik bioaktywny-dipeptyd muramyłowy (MDP) (25,112). Omawiany receptor wraz z wewnątrzkomórkowymi cytokinami TNF-alfa oraz INF-gama, uczestniczy w przekazywaniu sygnału prowadzącego do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kB. Lipopolisacharydy oraz peptydoglikany obecne zarówno w Gram dodatnich jak i ujemnych bakteriach, aktywują białko NOD2, dzięki rejonowi bogatemu w powtórzenia leucynowe (ang.: *leucin rich repeats*; LRR). Prowadzi to do eliminacji bakterii oraz produktów ich rozpadu przez komórki nabłonka jelita. W chorobie Leśniowskiego-Crohna proces ten może zostać zaburzony, w wyniku zmienionej mutacją funkcji genu. Dowodem na to są wyniki badań wykazujące zmniejszoną odpowiedź na lipopolisacharydy i peptydoglikany bakteryjne

u pacjentów z najczęstszymi wariantami genu *NOD2/CARD 15* (140). Do tej pory opracowano 125 odmian polimorficznych genu *NOD2/CARD 15*. Trzy z nich wykazują asocjacje z chorobą Leśniowskiego-Crohna, nie wykazując ich z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Częstość ich występowania wynosi od 25 do 43% u osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna (25,26). Omawiane polimorfizmy zlokalizowane są na regionach bogatych w powtórzenia leucynowe. SNP 13 (ang.: *single nucleotide polymorphism*; w pozycji 13) to mutacja polegająca na insercji cytozyny (leu 1007insC), jest mutacją typu zmiany ramki odczytu (ang. frame-shift). Natomiast pozostałe mutacje GLY908ARG (SNP8) oraz ARG702TRP (SNP12) to mutacje typu zmiany sensu prowadzące do zmiany sekwencji białkowej. Ryzyko rozwinięcia choroby Leśniowskiego-Crohna wzrasta czterokrotnie w przypadku nosicielstwa jednego z wymienionych genów w układzie heterozygotycznym, zaś 15 do 40 razy w przypadku homozygoty (45).

Najczęściej występujący w Polsce polimorfizm genu *NOD2/CARD15* to SNP5. W przypadku tej mutacji cytozyna zostaje zastąpiona w pozycji 802 tyminą, co prawdopodobnie sprzyja manifestacji objawów pozajelitowych oraz wczesnemu zachorowaniu (61,62,63,197).

Badania przeprowadzone u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna w województwie łódzkim wykazują występowanie mutacji genu *NOD2/CARD15* w 1/3 przypadków, przy czym najczęściej występowała mutacja 802C/T (151,152).

Niewiele jest publikacji dotyczących manifestacji klinicznej choroby w populacji dziecięcej w powiązaniu z uwarunkowaniami genetycznymi chorób zapalnych jelit, co uzasadnia celowość prowadzenia zarówno badań podjętych w niniejszej rozprawie doktorskiej jak i ich kontynuowanie w dalszych badaniach prospektywnych. Jednym z nich mogą być także badania dotyczące roli MicroRNAs jako regulujących ekspresję białek i genów w wieloczynnikowych immunologicznie modyfikowanych chorobach jak np. NZJ. (210)

II. CELE

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost przypadków zachorowań na nieswoiste choroby zapalne jelit, a także obniżanie wieku ich występowania, zwłaszcza wśród ludzi młodych, w tym dzieci. W związku z istniejącym stale problemem dotyczącym możliwie szybkiego, jednoznacznego postawienia prawidłowego rozpoznania różnicowego (choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego czy zapalenie jelita nieokreślone) i powiązanego z nim szybkiego wdrożenia leczenia kierunkowego, za istotne uznać należy opracowanie nowych, szybkich - wystarczająco dyskryminujących objawy kliniczne (zapalne) mikrobiologiczne i genetyczne, swoiste dla poszczególnych jednostek – nieinwazyjnych testów diagnostycznych.

Biorąc pod uwagę fakt braku odpowiedniej informacji w piśmiennictwie specjalistycznym na powyżej opisane powiązania, a także pragnąc – w oparciu o zaplanowane jednoczesowe i kompleksowe badania w trzech obszarach etiopatogenetycznych choroby – postanowiono w rozprawie przeanalizować następujące **cele główne**, których realizacja pomogłaby poprawić diagnostykę, terapię oraz prognozowanie przebiegu nieswoistych chorób zapalnych u dzieci:

1. ocenę przydatności jednoczesowego badania wybranych markerów zapalnych: dimerowej formy kinazy pirogronianowej guza (M2-PK), kalprotektyny oraz laktoferyny w kale jako wykładników aktywności procesu chorobowego u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit (NZJ).
2. ocenę przydatności markerów zapalnych i zmian liczebności wybranych szczepów bakteryjnych i grzybów w kale u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit w procesie weryfikacji rozpoznania jednej z trzech podstawowych postaci NZJ.
3. analizę częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* w badanej populacji dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit.

W celu realizacji tak zaplanowanych głównych celów pracy uzupełniono je poniżej podanymi **celami szczegółowymi**.

1. ocena przydatności oznaczania markerów kałowych jako parametru pozwalającego różnicować postaci kliniczne nieswoistych zapaleń jelit u dzieci tj. chorobę Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita i nieokreślone zapalenie jelit.
2. ocena zależności pomiędzy poziomem markerów kałowych, a tradycyjnymi parametrami stanu zapalnego, oznaczonymi we krwi.
3. ilościowa i jakościowa ocena dysbiozy (mikrobiota) w przewodzie pokarmowym u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit.
4. ocena zależności pomiędzy liczebnością wybranych mikroorganizmów, a poziomem markerów kałowych w poszczególnych postaciach klinicznych i stopniach ciężkości NZJ.
5. charakterystyka profilu mikrobiota w zależności od wieku dziecka i upływu czasu od postawienia rozpoznania.

III. MATERIAŁY I METODY

1. Pacjenci

Do badań zakwalifikowano 108 dzieci hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w okresie od 1 czerwca 2009 do 1 lutego 2011 roku. Wśród pacjentów było 63 chłopców (58,7%) oraz 45 dziewczynek (41,3%). U wszystkich dzieci zakwalifikowanych do badania stwierdzono nieswoiste choroby zapalne jelit: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (CU) stwierdzono u 37 pacjentów (33 %); chorobę Leśniowskiego – Crohna (CD) u 47 (44 %); niesklasyfikowane zapalenie jelita grubego (IC) zdiagnozowano u 24 dzieci (23%). Wiek badanych dzieci mieścił się w przedziale od 2. roku do 18. lat. Najliczniej reprezentowaną grupą wiekową były dzieci w wieku 11 – 15 lat (56,5%).

Ogólną charakterystykę liczbową grupy badanej w zależności od rozpoznania przedstawiono w tabeli 3. (*Uwaga: tabele nr 1 i 2 zamieszczone są w aneksie pracy*)

Tabela 3. Charakterystyka grupy badanej

Rozpoznanie	Chłopcy	Dziewczynki
CU	25	12
CD	25	22
IC	13	11
Razem	63	45

1.1. Badania dodatkowe

Rozpoznanie choroby NZJ następowało w oparciu o przyjęte w piśmiennictwie algorytmy postępowania diagnostycznego obejmujące: wywiad lekarski, badanie przedmiotowe oraz wyniki badań: laboratoryjnych, endoskopowych, radiologicznych i histopatologicznych.

W wywiadzie zwracano szczególną uwagę na następującą symptomatologię: liczbę stolców oddawanych w ciągu doby oraz ich wygląd, bóle brzucha, złe samopoczucie, gorączkę oraz uczucie parcia na stolec. U każdego z pacjentów wykonywano pomiary

antropometryczne – wysokości i masy ciała – celem oceny stanu odżywienia. Posłużono się w tym celu (wskaźnikiem Cole'a), do którego obliczenia zastosowano następujący wzór:

$$\text{Wsk. Cole'a (\%)} = [\text{masa ciała} \times \text{długość standardowa ciała}^2 / \text{standardowa masa ciała} \times \text{długość standardowa ciała}^2] \times 100$$

Uzyskana wartość była następnie wykorzystywana dla określenia stopnia aktywności choroby tj. CD, CU i CI (jako jeden z parametrów niezbędnych do obliczenia przyjętych w rozprawie kompleksowych wskaźników jej aktywności).

Arbitralnie przyjęto panel badań laboratoryjnych, który wykonywano u każdego pacjenta. W skład panelu wchodziły następujące badania: morfologia krwi obwodowej ze wzorem odsetkowym krwinek białych, stężenie białka C- reaktywnego w surowicy krwi (CRP), odczyn opadania krwinek czerwonych (OB), stężenie żelaza, stężenie fibrynogenu w osoczu, poziom hemoglobiny we krwi (HGB), liczbę płytek krwi (PLT), poziom białka całkowitego oraz albumin w osoczu krwi oraz stężenie immunoglobuliny IgG w osoczu. Wszystkie parametry oznaczano przy pomocy standardowo stosowanych metod diagnostycznych w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera w Poznaniu. Badania bakteriologiczne w celu wykluczenia/potwierdzenia infekcji mikrobiologicznej wykonywano w Laboratorium Mikrobiologicznym Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera w Poznaniu.

Badania endoskopowe przewodu pokarmowego obejmujące: kolonoskopię, gastrokopię przeprowadzono u wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do grupy badanej. Miejscem ich wykonania była Pracownia Endoskopii Przewodu Pokarmowego Kliniki Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Kierownik Pracowni: Dr hab. med. Iwona Ignys Prof. UMP). U każdego pacjenta w trakcie badań endoskopowych pobierano wycinki błony śluzowej przewodu pokarmowego celem wykonania badania histopatologicznego.

Analiza histopatologiczna wycinków błony śluzowej jelita grubego uzyskanych w trakcie badania endoskopowego przeprowadzona została w Pracowni Patomorfologii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu (Kierownik Pracowni: dr med. Ewa Trejster). Badanie histopatologiczne umożliwiło ostateczne potwierdzenie wstępnego rozpoznania i zgrupowanie pacjentów w podgrupach z: wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) lub colitis indeterminata (CI).

U analizowanych pacjentów przeprowadzono badania radiologiczne, takie jak: ultrasonografia jamy brzusznej, pasaż przewodu pokarmowego, wlew kontrastowy jelita grubego, enterografia jamy brzusznej (NMR) i/lub enterokliza (KT). Miejscem wykonania tych badań była Pracownia Ultrasonografii i Pracownia Radiologii Zakładu Radiologii Pediatricznej Szpitala Klinicznego im. Karola Marcinkowskiego w UM w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. Bogdan Pawlak). Enterografia/enterokliza wykonane zostały każdorazowo w Katedrze Radiologii UM Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

U 94 pacjentów wykonane zostały dodatkowo badania serologiczne w celu pełniejszego potwierdzenia postawionej diagnozy CU lub CD. W tym celu badano miana przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA) oraz wobec *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), a oznaczenia wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. Jan Żeromski).

1.2. Oznaczanie aktywności choroby

U każdego pacjenta, na podstawie przeprowadzonych badań podmiotowych, przedmiotowych oraz dodatkowych dokonano oceny aktywności choroby. U dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna wyznaczono Pediatriczny Indeks Aktywności (PCDAI – *Pediatric Crohn's Disease Activity Index*, modyfikacja J. Ryżko – patrz aneks Tabela 1). Zgodnie z zastosowaną skalą wszyscy pacjenci podzieleni zostali na 4 grupy aktywności:

- a) brak aktywności klinicznej choroby: 0 – 10 punktów
- b) łagodna postać choroby: 11 – 25 punktów
- c) umiarkowana postać choroby: 26 – 50 punktów
- d) ciężka postać choroby: >51 punktów

U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego aktywność choroby ocenioną za pomocą indeksu Truelove-Wittsa (modyfikacja J. Ryżko – patrz aneks Tabela 2.). Zgodnie z zastosowaną skalą wszyscy pacjenci podzieleni zostali na 3 grupy aktywności:

- a) łagodna postać choroby: 0-4 punkty
- b) umiarkowana postać choroby: 5 – 8 punktów
- c) ciężka postać choroby: 9 – 12 punktów

1.3. Podział pacjentów na grupy dla analizy statystycznej

Pacjentów zakwalifikowanych do badania zaliczono do jednej z trzech grup, w zależności od czasu, który upłynął od ostatecznego postawienia diagnozy. Miało to na celu ocenę wpływu czasu trwania choroby na poziom markerów analizowanych w kale. Dzieci zaliczone zostały do następujących grup:

- nowe rozpoznanie (rozpoznanie pierwszorazowe)
- rozpoznanie postawione w ciągu ostatnich, poprzedzających badanie kliniczne 12 miesięcy
- rozpoznanie postawione dłużej niż przed 12 miesiącami od daty wykonanego badania klinicznego

2. Oznaczenie poziomu markerów stanu zapalnego jelit w kale

U każdego pacjenta wykonano jednocześnie badanie stężenia 3 markerów stanu zapalnego jelit w kale: kalprotektyny (FC), laktoferyny (LF) i kinazy pirogronianowej guza (M2-PK). Analiza miała na celu potwierdzenia występowania choroby organicznej przewodu pokarmowego oraz ocenę założonej korelacji pomiędzy stopniem aktywności a poziomem markera w kale. Badania przeprowadzono w Instytucie Mikroekologii w Poznaniu (Kierownik: dr med. M. Gałęcka). Kał pobrany został od każdego z pacjentów biorących udział w badaniu po wyrażeniu pisemnej zgody na udział w analizie (pacjent bądź prawny opiekun w przypadku dzieci poniżej 16 r.ż) zgodnie z zasadami badania zaakceptowanymi decyzją Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 840/09 z 8.10.2009 roku.

UWAGA: Ze względów metodycznych przy podawanych wartościach oznaczeń kalprotektyny i laktoferyny zastosowano określenie: „stężenia”; zaś przy M2-PK określenie „aktywność”. Przy interpretacji łącznej wyników tych trzech markerów posłużono się określeniem „zmiany poziomów”.

Laktoferyna oznaczona została za pomocą testu IBD – Scan firmy Techlab, natomiast kinaza pirogronianowa guza z wykorzystaniem testu Tumor M2-PK Stool Test firmy ScheBo Biotech. Do oznaczenia stężenia kalprotektyny w kale zastosowano test PhiCal Calprotectin Elisa Kit firmy Immundiagnostik. Wszystkie wykorzystane testy bazują na immunoenzymatycznej technice Elisa, umożliwiającą ilościową detekcję badanej substancji w

kale. W celu wykonania badania od każdego pacjenta pobierano 3 próby kału w ilości minimum 5 g i mrożono je w temperaturze -20°C i tak przechowywano, aż do momentu wykonania oznaczenia. Przed wykonaniem analizy próby rozmrażano w temperaturze pokojowej.

2.1. Kalprotektyna

Do oznaczenia stężenia kalprotektyny w kale zastosowano test PhiCal Calprotectin Elisa Kit firmy Immundiagnostik. Do 100 mg kału dodawano 5 ml buforu ekstrakcyjnego i poddawano homogenizacji przez około 30 sekund (w zależności od konsystencji), a następnie wirowano przez 5 minut, przy szybkości 13000g. Otrzymany supernatant rozcieńczano w proporcji 1:50, a następnie 100 μl standardów, kontroli oraz rozcieńczonego supernatantu (podwójnie) przenoszono do studzienek reakcyjnych. Studzienki opłaskowane były przeciwciałami króliczymi przeciwko kalprotektynie. Szczelnie przykrytą płytkę inkubowano godzinę w temperaturze 37°C . Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5 – krotnie buforem płuczącym a następnie dodawano koniugatu zawierającego przeciwciała królicze klasy IgG znaczone alkaliczną fosfatazą przeciwko kalprotektynie. Kolejna inkubacja trwała 10 – 20 minut i prowadzona była w temperaturze pokojowej ($18 - 26^{\circ}\text{C}$), w zaciemnieniu. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie buforu STOP. Gęstość optyczną odczytywano przy użyciu spektrofotometru Sunrise firmy Tecan (Austria) i na podstawie dokonanego odczytu wyznaczano stężenia kalprotektyny w oparciu o krzywą wzorcową. Wyniki analizowano w oparciu o wytyczne producenta:

<15mg/l – stężenie fizjologiczne

od 15mg/l- stężenie podwyższone

2.2. Laktoferyna

Do oznaczenia stężenie laktoferyny w kale zastosowano test IBD – SCAN firmy Techlab. W tym celu 100 μl rozcieńczonego materiału biologicznego nanoszono do studzienek reakcyjnych. W pracy zastosowano następujące rozcieńczenia prób: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000. Jednocześnie na płytkę nanoszono po 100 μl kontroli dodatniej i ujemnej oraz roztworów standardowych. Dzięki temu możliwe było wykreślenie krzywej kalibracyjnej, gdzie oś rzędnych to znane stężenia roztworów standardowych, natomiast z osi odciętych możliwe było odczytanie stężenia laktoferyny w badanych próbach (na podstawie

zmierzonej absorbancji). Studzienki opłaszczone były króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko laktoferynie. Inkubacja prowadzona była przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5 – krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano koniugatu zawierającego królicze poliklonalne przeciwciała swoiste dla ludzkiej laktoferyny sprzężone z peroksydazą chrzanową i inkubowano ponownie w temperaturze 37°C przez 30 minut. W kolejnym etapie do każdej studzienki reakcyjnej dodawano substratu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie buforu STOP. Gęstość optyczną odczytywano przy użyciu spektrofotometru Sunrise firmy Tecan (Austria) i na podstawie dokonanego odczytu wyznaczano stężenia laktoferyny w oparciu o krzywą wzorcową. Wyniki analizowano w oparciu o wytyczne producenta:

0 – 7,24 µg/g (ml) – stężenie fizjologiczne,
od 7,25 µg/g (ml) – stężenie podwyższone

2.3. Kinaza pirogronianowa guza

Do oznaczenia aktywności kinazy pirogronianowej typu 2 zastosowano test ScheBo Tumor M2-PK. W tym celu 50µl rozcieńczonego materiału biologicznego nanoszono do studzienek reakcyjnych. W pracy zastosowano następujące rozcieńczenia: 1:1, 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:10000. Jednocześnie na płytkę nanoszono 50µl roztworów standardowych oraz kontroli dodatniej i ujemnej. Na podstawie stężenia roztworów standardowych wykreślono krzywą kalibracyjną, gdzie oś rzędnych to stężenia standardów, natomiast z osi odciętych odczytywano aktywność kinazy pirogronianowej w badanych próbach (na podstawie zmierzonej absorbancji). Studzienki opłaszczone są specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko dimerowej formie kinazy pirogronianowej. Nie reagują one z żadną inną formą kinazy pirogronianowej (L, R, M1, M2). Inkubacja prowadzona była przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 3 – krotnie buforem płuczającym, a następnie dodawano koniugatu zawierającego drugie przeciwciało swoiste dla M2-PK sprzężone z biotyną i inkubowano ponownie w temperaturze pokojowej przez 30 minut. W kolejnym etapie do każdej studzienki reakcyjnej dodawano układu peroksydaza chrzanowa – streptawidyna i inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie buforu STOP. Gęstość optyczną odczytywano przy użyciu spektrofotometru Sunrise firmy

Tecan (Austria) i na podstawie dokonanego odczytu wyznaczano aktywność dimerowej formy kinazy pirogronianowej w oparciu o krzywą wzorcową. Wyniki analizowano w oparciu o wytyczne producenta:

0 – 4 U/ ml – aktywność fizjologiczna,

od 4 U/ ml – aktywność podwyższona

3. Jakościowe i ilościowe badanie bakterii i grzybów w kale

3.1. Analiza bakteriologiczna

Pobrano od pacjentów kał analizowany był pod kątem występowania i liczebności wybranych bakterii wskaźnikowych. Przyjęta metodyka badania pozwala w sposób ilościowy określić poszczególne rodzaje bakterii znajdujących się w przewodzie pokarmowym człowieka oraz łączną liczbę bakterii.

Materiał do oznaczeń pobierany był z 8 różnych miejsc po uprzednim przemieszaniu badanego kału, celem ujednoczenia próby. Oznaczenia dokonywano w ciągu 2 dni od momentu pobrania kału, a do tego momentu przechowywano go w temperaturze 4°C. Do analizy pobierano 0,25 g kału. Materiał umieszczano w 2,250 ml jałowej soli fizjologicznej (rozcieńczenie 10^{-1}). Po wymieszaniu na wytrząsarce przenoszono 250 μ l zawiesiny do następnej próbki z 2,250 ml jałowej soli fizjologicznej (rozcieńczenie 10^{-2}). W ten sposób postępowano z kolejnymi próbkami, uzyskując szereg rozcieńczeń aż do 10^{-8} . Po 50 μ l zawiesiny z kolejnych rozcieńczeń posiewano na szereg wybiórczo-różnicujących i namnażających podłoży. Na poszczególne podłoża stałe materiał przenoszono i rozprowadzano jałową eżą. Na podłoże agarowe z 5% krwią baranią (bioMerieux) nanoszono 50 μ l zawiesiny z rozcieńczenia 10^{-8} w celu uzyskania wzrostu całkowitej liczby bakterii. 50 μ l zawiesiny rozcieńczonej do wartości 10^{-6} przenoszono na 2 podłoża wybiórcze - agar Schaedlera (Heipha) dla beztlenowych bakterii z rodzaju *Bacteroides* i agar DIC (Heipha) dla hodowli beztlenowych pałeczek z rodzaju *Bifidobacterium*. 50 μ l zawiesiny rozcieńczonej do wartości 10^{-5} oraz 10^{-3} nanoszono na podłoże chromogenne CPS (bioMerieux) w celu wykrycia bakterii z rodzaju *Enterococcus* i pałeczek z gatunku *Escherichia coli*. Na podłożach tych wstępnie różnicowano także inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*) oraz pałeczki z rodzaju *Pseudomonas*. Zawiesina w rozcieńczeniu 10^{-3} została ponadto

wykorzystywana dla stwierdzenia obecności potencjalnie patologicznej formy *E. coli* (śluzowe, laktozoujemne kolonie). W tym celu stosowano podłoże Endo (Heipha). Z rozcieńczenia 10^{-3} poszukiwano w badanej próbie również beztlenowych laseczek z rodzaju *Clostridium* [podłoże SPM (Heipha)] oraz pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*. Dzięki wykorzystaniu unikatowych, opatentowanych podłoży Rogosa z peroksydazą i związkami TMB (Heipha) zapewniony jest nie tylko optymalny wzrost hodowli *Lactobacillus*, lecz również określenie udziału w próbie pałeczek kwasu mlekowego produkujących nadtlenek wodoru. Założoną hodowlę prowadzono w odpowiednich warunkach:

- dla określenia całkowitej liczby bakterii, bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* – inkubację prowadzono 48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych.
- dla hodowli pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* inkubację prowadzono w warunkach o podwyższonym stężeniu CO₂, przez 48 godzin w temperaturze 37°C.
- dla hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus*, pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczek z rodzaju *Proteus* inkubację prowadzono w warunkach tlenowych przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

Po określonym czasie inkubacji wszystkie hodowle poddane zostały diagnostyce mikrobiologicznej.

3.2. Podział analizowanych drobnoustrojów na grupy w zależności od pełnionej funkcji

Dla oceny ewentualnej korelacji pomiędzy zaostreniem stanu zapalnego u pacjenta a licznością drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym postanowiono, w zależności od pełnionej w organizmie funkcji, podzielić bakterie na 3 grupy:

1. bakterie pełniące funkcje ochronne (*Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, *H₂O₂-Lactobacillus*)
2. bakterie pełniące funkcje immunostymulujące (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*)
3. bakterie o właściwościach proteolitycznych (śluzowe, laktozo ujemne szczepy *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*).

3.3 Analiza mykologiczna

Pobrano od pacjentów kał analizowany był pod kątem występowania i liczebności wybranych grzybów. Przeprowadzone badanie pozwala w sposób ilościowy określić rodzaje grzybów drożdżopodobnych oraz grzybów pleśniowych występujących w przewodzie pokarmowym na podstawie badania kału. Materiał pobierany był z 8 różnych miejsc po uprzednim przemieszaniu badanego kału, celem ujednoczenia próby. Oznaczenia wykonywano w ciągu 2 dni od pobrania, a do tego momentu kał przechowywany był w temperaturze 4°C. Do analizy pobierano 0,25 g kału. Ilość tą umieszczano w 2,5 ml roztworze trypsyny z dodatkiem 25 µl antybiotyków (Penicylina i Streptomycyna) w celu zahamowania wzrostu bakterii. Tak przygotowaną próbę, po rozmieszczeniu na wytrząsarce, umieszczano na 15 minut w komorze inkubacyjno-wytrząsającej w temperaturze 37°C, w celu nadtrawienia resztek pokarmowych mogących uniemożliwić wzrost grzybom. W kolejnym etapie 400 µl badanej próby przenoszono do 1,6 ml zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS) w celu przepłukania. 100 µl z roztworu PBS przenoszono na 2 podłoża agarowe Sabouraud z chloramfenikolem (bioMerieux). Jedną płytkę z badaną próbą inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin, a drugą w temperaturze pokojowej przez ten sam okres czasu. Takie działanie pozwala odróżnić grzyby będące tylko „pasażerami” ze środowiska, od grzybów potencjalnie chorobotwórczych. W przypadku wzrostu grzybów przeprowadza się następnie diagnostykę mikologiczną - grzyby drożdżopodobne identyfikuje się wstępnie do gatunku przy użyciu podłoża chromogennego CHOMagar Candida (Becton Dickinson). Grzyby pleśniowe identyfikuje się w oparciu o preparat bezpośredni i klucz mikologiczny.

4. Analiza genetyczna

4.1. Materiał

Materiał do badań molekularnych stanowił kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), wyizolowany z komórek jądrzastych krwi obwodowej, pobranej od 82 pacjentów, włączonych do niniejszej analizy. Grupa kontrolna składała się z 77 osób płci męskiej oraz tej samej liczby płci żeńskiej (łącznie 154 osoby), losowo wybranych z populacji polskiej, zaś wiekowo zbliżonej do grupy badanej. Materiał DNA wykorzystany w rozprawie doktorskiej gromadzono na przestrzeni ostatnich pięciu lat i przechowywano w banku DNA w Zakładzie Funkcji Kwasów Nukleinowych w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 34 (prof. J. Nowak, prof. R. Słomski, prof. A. Pławski)

4.2. Metody

4.2.1. Analizy DNA

a) Izolacja DNA z zastosowaniem izotiocyanianu guanidyny (GTC)

Celem procesu izolacji było uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA, pobawionego wszelkich zanieczyszczeń, takich jak białka czy enzymy, które mogą być inhibitorami w czasie reakcji wykonywanych podczas analiz. DNA po wyizolowaniu jest oceniany pod względem ilości zanieczyszczeń oraz stężenia, a następnie zamrażany w -20°C i w takich warunkach może być przechowywany przez lata.

b) Ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów DNA

Analiza ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów DNA stanowiła jeden z pierwszych etapów pracy z materiałem genetycznym i miała na celu określenie jego czystości oraz stężenia. Do analizy stosowano pomiar absorpcji światła UV z zastosowaniem spektrofotometru. Przed przystąpieniem do pomiaru spektrofotometr (Nanodrop) odpowiednio skalibrowano, a próby rozcieńczono 100 x wodą. Po kalibracji odczytywano punktowo wartość absorpcji przy 260, 280 i 320 nm. Pomiary wykonywano w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 10 nm.

Stężenie dwuniciowego DNA (C) obliczono ze wzoru:

$$C (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{rozcieńczenie}$$

Dla oceny stopnia zanieczyszczenia DNA wyznaczono stosunek absorpcji A_{260}/A_{280} . W przypadku, gdy mieścił się on w granicach 1,8 – 2,0 to DNA jest wystarczająco oczyszczony.

c) Reakcja PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) umożliwiła specyficzne powielenie wybranych odcinków DNA. Synteza komplementarnych nici DNA do sekwencji kodujących genu jest ograniczona położeniem specyficznych starterów. W każdym z kolejnych cykli reakcji liczba kopii fragmentu ograniczonego starterami wzrastała wykładniczo. Otrzymane w ten sposób produkty stanowią substrat do dalszych analizy. W niniejszej pracy amplifikacji poddawano fragmenty genu *NOD2* obejmujące odpowiednio,

c.802C>T(P268S), c.2104C>T (R702W), c.2722G>C (G908R) dla wykonania analizy restrykcyjnej. Produkty reakcji PCR były sprawdzane na żelu agarozowym. Badania insercji 1007fsins (c.3020insC) wykonano za zastosowaniem analizy PCR-SSCP.

d) Analiza restrykcyjna

Enzymy restrykcyjne to endonukleazy, mające zdolność hydrolizy nici DNA, jeśli w badanym fragmencie znajduje się sekwencja nukleotydów rozpoznawana przez enzym. Sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne to najczęściej kilkunukleotydowe fragmenty, często palindromowe. Hydroliza następuje w obrębie rozpoznawanej sekwencji lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Ta właściwość enzymów restrykcyjnych pozwala na analizowanie występowania sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny w badanej sekwencji. Występowanie polimorfizmów może prowadzić do powstawania sekwencji rozpoznawanej przez enzym lub jej zaniku. Hydroliza enzymem restrykcyjnym pozwala na szybkie i jednoznaczne określenie czy taka sekwencja występuje lub nie a tym samym czy doszło do badanej zmiany nukleotydów. Amplifikowane fragmenty genu *NOD2* obejmujące fragmenty zawierające polimorfizmy 802C>T, 2104C>T, 2722G>C były poddane analizie restrykcyjnej z zastosowaniem odpowiednich endonukleaz.

e) Rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym

Celem rozdziału elektroforetycznego jest sprawdzenie wyniku reakcji PCR oraz rozdział uzyskanych fragmentów i ocena ich wielkości. Jednymi z najbardziej popularnych technik rozdziałów mikrocząstek są techniki elektroforetyczne, które pozwalają osiągnąć wysoki poziom rozdzielczości. W elektroforezie wykorzystuje się zjawisko przemieszczania się cząstek o niezrównoważonym ładunku elektrycznym w polu elektrycznym. Wykorzystując zależność prędkości przemieszczania się cząsteczki od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów środowiska, można dokonać szybkiej separacji różnych makrocząsteczek. Nakład kosztów w tej metodzie jest niski, a stosowane urządzenia są proste. Te względy zdecydowały o popularności metody oraz jej szerokim zastosowaniu.

f) Analiza PCR-SSCP

Analiza PCR-SSCP, czyli badanie polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (ang. Single Strand Conformation Polymorphism) jest jedną z najczęściej stosowanych technik elektroforetycznych, umożliwiających wykrywanie punktowych zmian

w DNA. W praktyce najlepsze wyniki, ponad 95% wykrywalność zmian, uzyskuje się dla fragmentów DNA o wielkości 100-300 pz. Metoda opiera się na denaturacji termicznej produktów reakcji PCR z dodatkiem czynnika denaturującego, szybkim schłodzeniu a następnie ich rozdziale w natywnym żelu poliakryloamidowym. W warunkach niedenaturujących, jednoniciowe struktury tworzą wewnętrzne sparowania prowadzące do przyjęcia określonej konformacji przez pojedyncze nici DNA. Fragmenty o tej samej długości i sekwencji tworzą takie same konformery. Zmiana w sekwencji lub długości amplifikowanego fragmentu prowadzi do powstania odmiennego konformeru, charakteryzującego się odmienną ruchliwością elektroforetyczną. Różnice w migracji konformerów uwidocznione są na żelu po przeprowadzeniu detekcji DNA metodą wybarwiania przy pomocy azotanu srebra. W czasie analizy jest możliwe powiązanie określonego wzoru tworzonego przez prążki w analizie SSCP z genotypem. Umożliwia to szybkie i tanie genotypowanie dużej liczby próbek. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy napięciu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. Zastosowaną metodą detekcji DNA w żelu poliakryloamidowym było srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Po zakończeniu procedury srebrzenia, żełe zostały wysuszone na bibule typu Whatman.

g) Detekcja DNA azotanem srebra

Barwienie DNA srebrem jest wydajną i czułą metodą detekcji DNA w żelach poliakryloamidowych. Umożliwia detekcję 1-10 pg DNA na mm². Jest to technika fotochemiczna, podobna do reakcji wykorzystywanych w fotografii. Reakcję przeprowadza się w trzech etapach. Pierwszym etapem jest przygotowanie żelu po elektroforezie, polegające na umieszczeniu żelu w etanolu. Celem zabiegu jest odwodnienie żelu w skutego, czego łatwiej reaguje z kolejnymi odczynnikami, jednocześnie następuje utrwalenie DNA w żelu. Kolejnym etapem jest utlenianie DNA kwasem azotowym. Barwienie DNA przeprowadza się poprzez inkubację żelu w azotanie srebra z dodatkiem formaldehydu redukującego srebro do formy metalicznej wiążącej się z DNA. Dodanie węgla sodu powoduje uwidocznienie prążków w żelu. Reakcję wywoływania prowadzi się stopniowo do uzyskania optymalnej intensywności prążków. Reakcję uwidaczniania prążków przerywa się obniżając pH poprzez dodanie kwasu octowego. Następnie inkubacja żelu w kwasie ma na celu jego utrwalenie.

5. Analiza statystyczna

W analizie poziomu markerów stanu zapalnego oraz bakterii wykorzystano miary statystyki opisowej, w tym: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę, kwartył dolny i kwartył górny. Weryfikacji normalności rozkładu tych zmiennych dokonano testem Shapiro-Wilka. Z uwagi na nie spełnienie kryterium normalności, dla stwierdzenia istotności różnic w poziomie badanych markerów oraz liczebności bakterii pomiędzy określonymi grupami pacjentów zastosowano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa. W przypadku zmiennej dychotomicznej, jaką jest płeć, analizy istotności różnic w poziomie markerów pomiędzy grupą dziewczynek i chłopców dokonano stosując test nieparametryczny U Manna-Whitneya.

Przeprowadzono również analizę zależności pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a poziomem markerów oraz liczebnością drobnoustrojów. Z uwagi na sygnalizowany wcześniej brak normalności rozkładu, obserwowany w przypadku markerów stanu zapalnego i poszczególnych rodzajów mikroorganizmów zastosowano test korelacji rang R Spearmana. Współczynniki korelacji rang R Spearmana obliczono także analizując zależności pomiędzy markerami stanu zapalnego a klasycznymi parametrami zapalnymi oznaczanymi u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. W rozdziale poświęconym charakterystyce wybranych grup mikroorganizmów jelitowych, współczynniki korelacji rang R Spearmana zostały wyznaczone w badaniu zależności pomiędzy liczebnością drobnoustrojów a takimi wielkościami, jak: wiek pacjentów i długość czasu od postawienia diagnozy choroby oraz poziom markera stanu zapalnego.

Analizę statystyczną badanych wariantów polimorficznych przeprowadzono zastosowaniem testu Chi kwadrat (χ^2) oraz dokładnego testu Fishera (ang. Fisher's Exact Test)

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Uchwałą nr 840/09 z dnia 8.10.2009 roku.

IV. WYNIKI

1. Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem płci i wieku

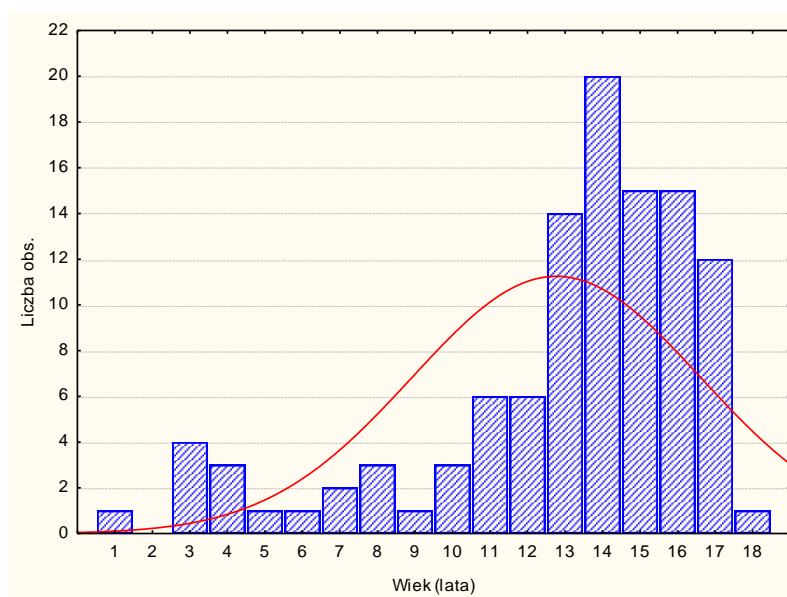
W badaniu udział wzięło 108 dzieci, u których zdiagnozowano nieswoiste choroby zapalne jelit: chorobę Leśniowskiego – Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz nieokreślone zapalenie jelit. Pacjenci hospitalizowani byli na Oddziale Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu.

Do analizy włączono 45 dziewczynek i 63 chłopców. Dzieci zakwalifikowane do badania podzielono na 3 grupy wiekowe. Sposób klasyfikacji pacjentów i rozkład uzyskanych wyników zaprezentowano w tabeli 4 i rycinie 1.

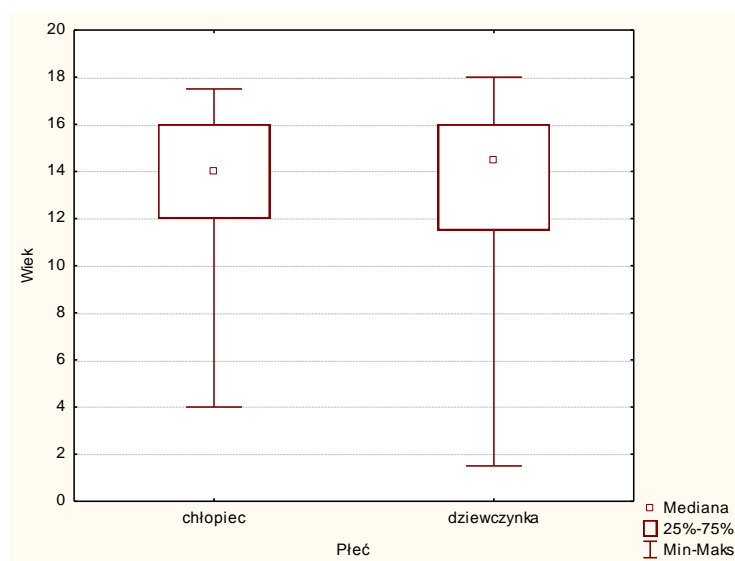
Tabela 4. Rozkład procentowy grupy badanej pod względem płci i wieku

Wiek	Płeć		Razem %
	Dziewczynki %	Chłopcy %	
do 10 lat	24,4	12,7	17,6
11-15 lat	48,9	61,9	56,5
16 i więcej lat	26,7	25,4	25,9
Razem %	41,7	58,3	100,0

a)



b)



Rycina 1 a, b . Rozkład wieku u dzieci w grupie badanej

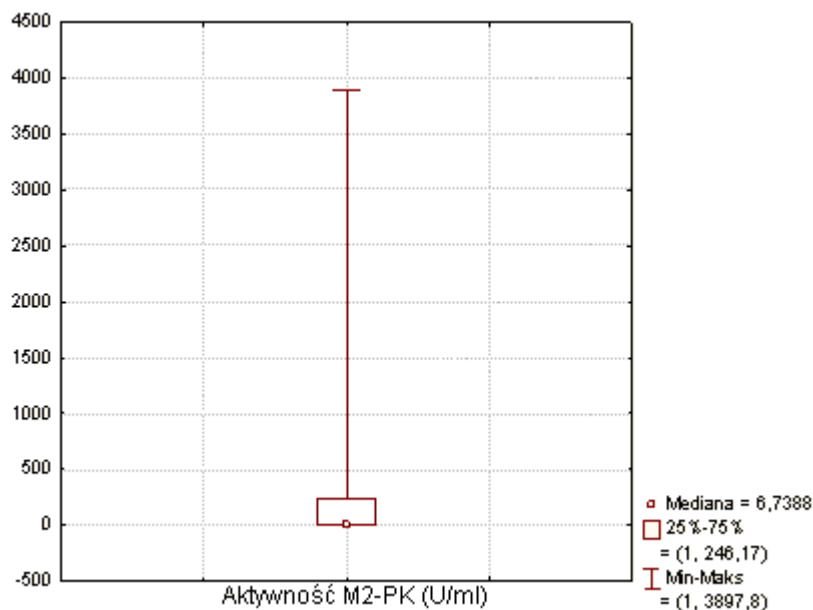
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie wieku pomiędzy grupą chłopców i grupą dziewczynek. Najliczej reprezentowane w próbie są dzieci w wieku 11 – 15 lat (56,5%) i prawidłowość ta dotyczy zarówno dziewczynek (48,9%) jak i chłopców (61,9%).

2. Charakterystyka poziomu markerów stanu zapalnego w grupie badanej

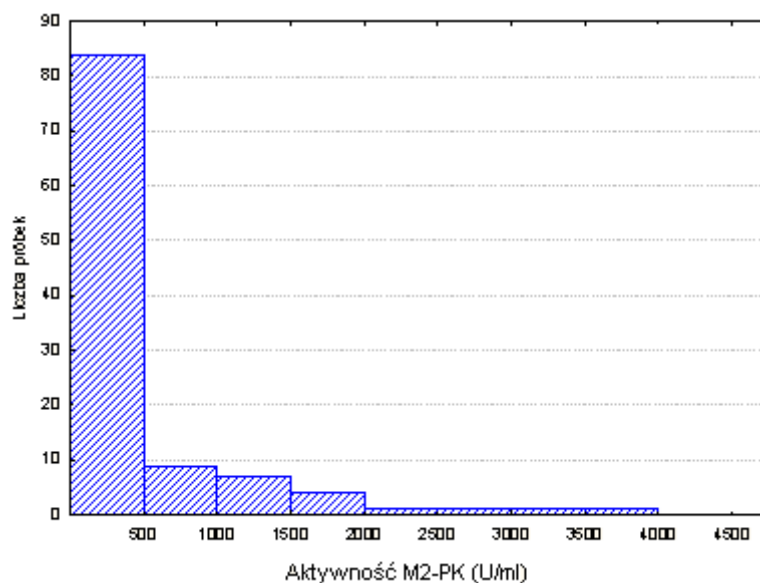
- Ogólny rozkład zmiany poziomów markerów stanu zapalnego w kale

Na rycinach 2, 3 i 4 a, b zaprezentowano rozkład stężenia markerów zapalnych w badanej grupie pacjentów. Aktywność M2-PK w kale dzieci chorych mieścił się w zakresie od <1 do 3897,8 U/ml (rycina 2 a, b). Stężenie kalprotektyny w stolcu kształtowało się w zakresie 1,6 do 53,75 mg/ g (rycina 3 a, b), natomiast laktoferyny 0,27 – 1132,84 $\mu\text{g/g}$ (rycina 4 a,b).

a)



b)



Rycina 2 a,b. Rozkład aktywności M2-PK w kale dzieci z grupy badanej

Dokładne poziomy aktywności M2-PK w kale pacjentów przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Poziom aktywności M2-PK w kale dzieci z grupy badanej

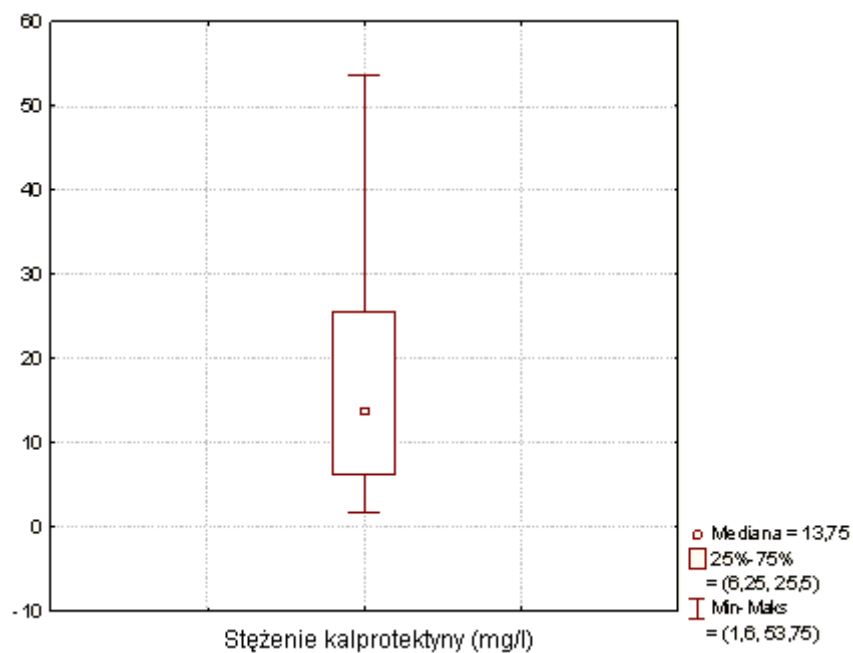
Rozpoznanie	Aktywność M2-PK (U/ml)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	37	405,80	809,12	1,00	3433,80	1,92	16,65	461,46
CD	47	462,59	800,19	1,00	3897,80	1,89	17,23	846,25
IC	24	42,85	195,75	1,00	961,58	1,00	1,00	2,14
Ogółem	108	349,86	729,09	1,00	3897,80	1,00	6,74	246,17

Przeanalizowano liczbę prób kału dla poszczególnych wartości M2-PK (rycina 2a, b). Wykazano, iż u 49 dzieci wynik mieścił się w granicach normy. U wszystkich tych pacjentów występował brak aktywności choroby, oceniono ją jako stan łagodny lub colitis indeterminata.

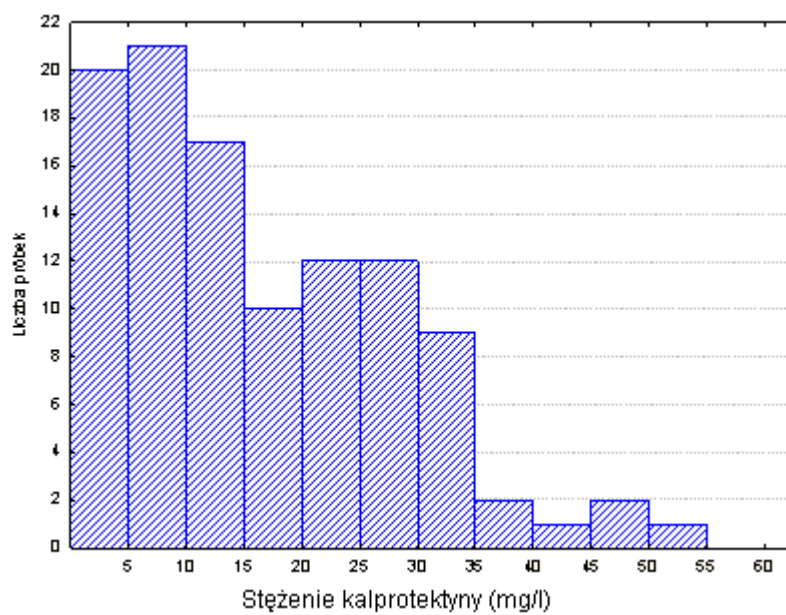
- CU: łagodna postać – 11 osób
- CD: brak aktywności- 15 osób
 łagodna postać: 3
- IC: 20 osób

W pozostałych 59 przypadkach marker był wyraźnie podwyższony.

a)



b)



Rycina 3 a,b. Rozkład stężenia kalprotektyny w kale dzieci z grupy badanej

Dokładne wartości stężenia kalprotektyny w kale pacjentów przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Wartości stężenia kalprotektyny w kale dzieci z grupy badanej

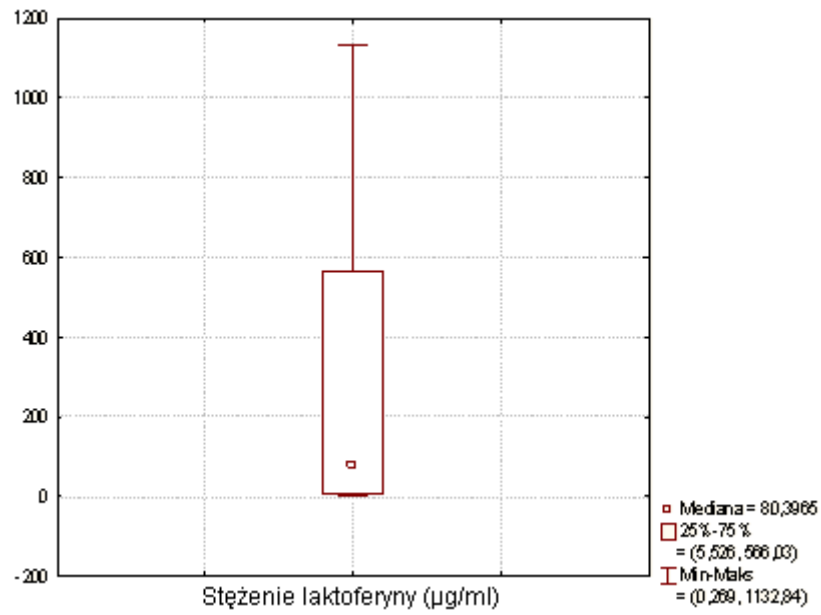
Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
Rozpoznanie	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	37	12,90	2,50	53,75	8,75	17,50	27,50
CD	47	11,02	1,60	49,96	8,99	15,52	26,29
IC	23	6,82	2,86	32,50	3,50	6,00	10,00
Ogółem	107	11,78	1,60	53,75	6,25	13,75	25,50

Przeanalizowano rozkład liczby prób kału dla poszczególnych wartości stężenia kalprotektyny (rycina 3a,b). Wykazano, iż u 55 dzieci wynik mieścił się w granicach normy. U 52 z tych pacjentów występował brak aktywności choroby albo oceniono ją jako: stan łagodny, umiarkowany lub colitis indeterminata, zaś u 3 pacjentów stwierdzono ciężką postać choroby.

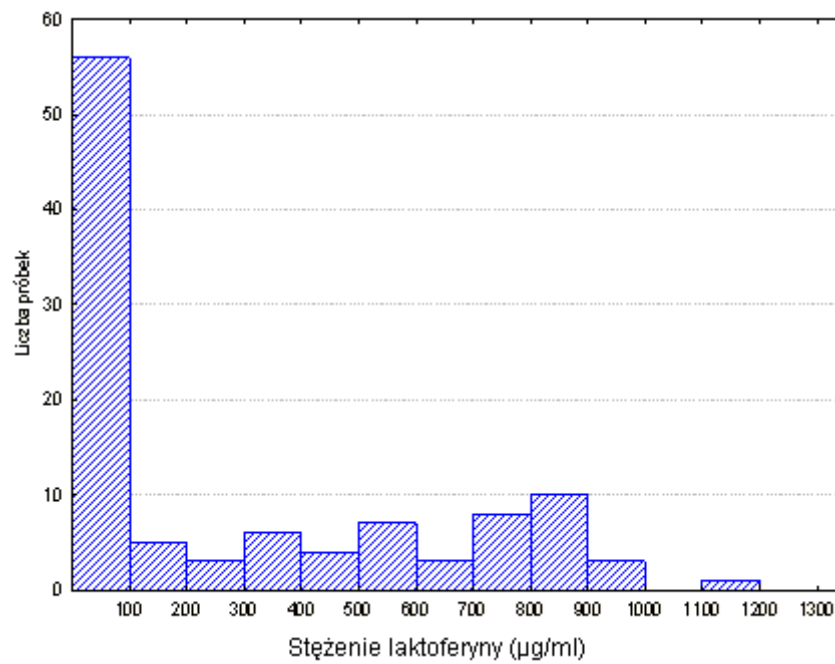
- CU: łagodna postać – 12 osób
umiarkowana postać – 2 osob
ciężka postać – 1 osoba
- CD: brak aktywności- 10 osób
łagodna postać: 5
umiarkowana postać – 5 osób
ciężka postać – 2 osoby
- IC: 18 osób

W pozostałych 52 przypadkach stężenie kalprotektyny było wyraźnie podwyższone.

a)



b)



Rycina 4 a,b. Rozkład stężenia laktoferyny w kale dzieci z grupy badanej

Dokładne wartości stężenia laktoferyny w kale pacjentów przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wartości stężenia laktoferyny w kale dzieci z grupy badanej

Stężenie laktoferyny (ug/ml)							
Rozpoznanie	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	36	317,37	0,34	957,74	20,28	170,63	551,63
CD	46	359,50	0,64	1132,84	38,18	395,65	781,09
IC	24	154,79	0,27	755,33	0,77	1,89	8,45
Ogółem	106	338,72	0,27	1132,84	5,53	80,40	566,03

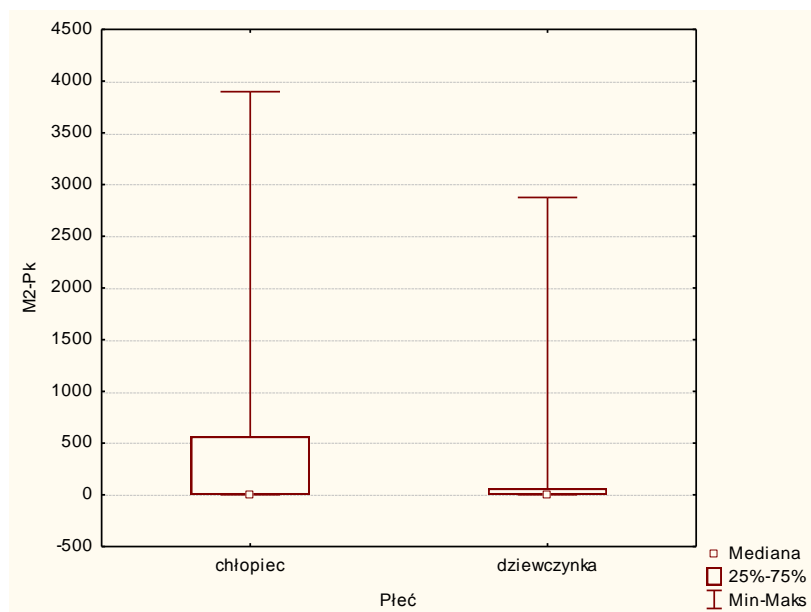
Przeanalizowano rozkład liczby prób kału dla poszczególnych wartości stężenia laktoferyny (rycina 4). Wykazano, iż tylko u 29 dzieci wynik mieścił się w granicach normy. U wszystkich pacjentów w tej grupie występował brak aktywności choroby, oceniono ją jako stan łagodny lub colitis indeterminata.

- CU: łagodna postać – 7osób
- CD: brak aktywności- 7 osób
- IC: 15 osób

W pozostałych 77 przypadkach był wyraźnie podwyższony.

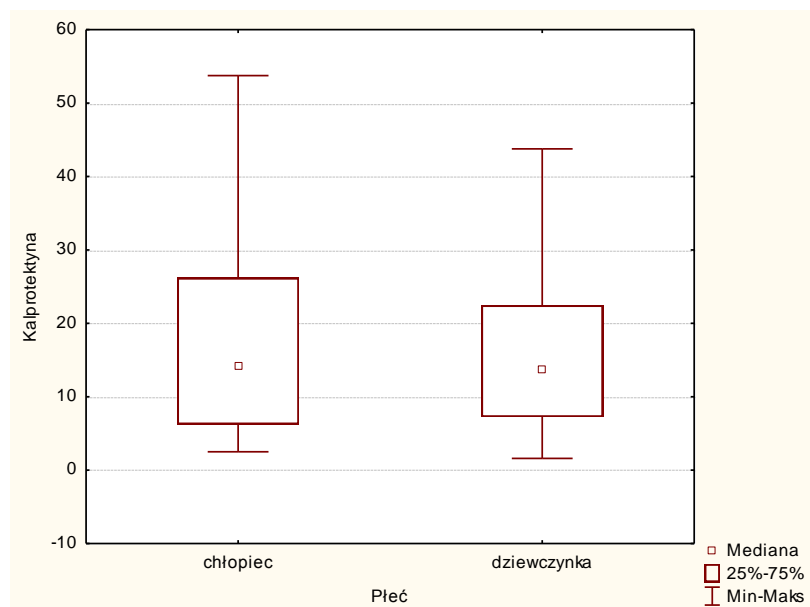
- Rozkład stężenia markerów w zależności od płci

Postanowiono określić czy występują istotne statystycznie różnice w poziomie poszczególnych markerów w zależności od płci. Na rycinie 5 przedstawiono rozkład stężenia M2-PK w grupie chłopców i dziewczynek. W grupie chłopców aktywność markera mieściła się w zakresie od 1 – 3897,80 U/ml, natomiast u dziewczynek 0 – 2875,60 U/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy obiema grupami.



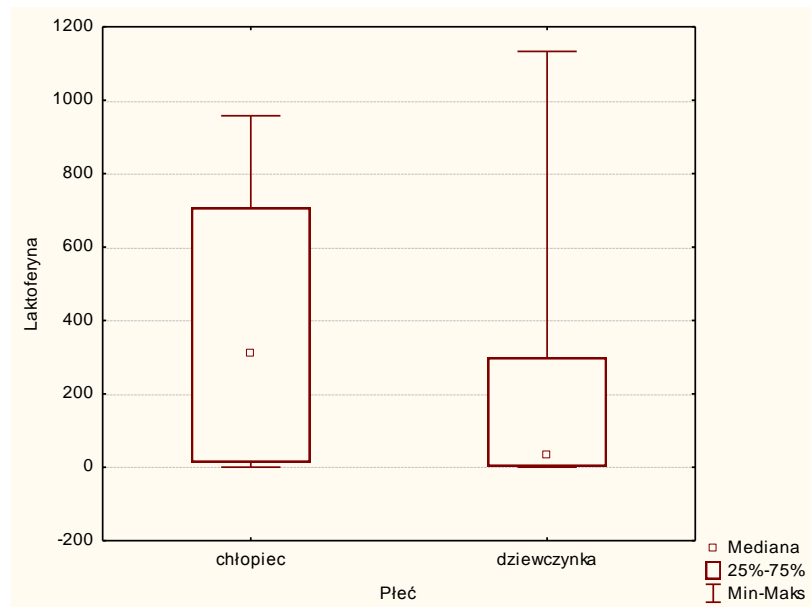
Rycina 5. Aktywność M2-PK w kale w zależności od płci

Na rycinie 6 przedstawiono rozkład stężenia kalprotektyny w grupie chłopców i dziewczynek. W grupie chłopców aktywność markera mieściła się w zakresie od 2,5 - 53,75 mg/l natomiast u dziewczynek 1,6 – 43,76 mg/l. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy obiema grupami.



Rycina 6. Stężenie kalprotektyny w kale w zależności od płci

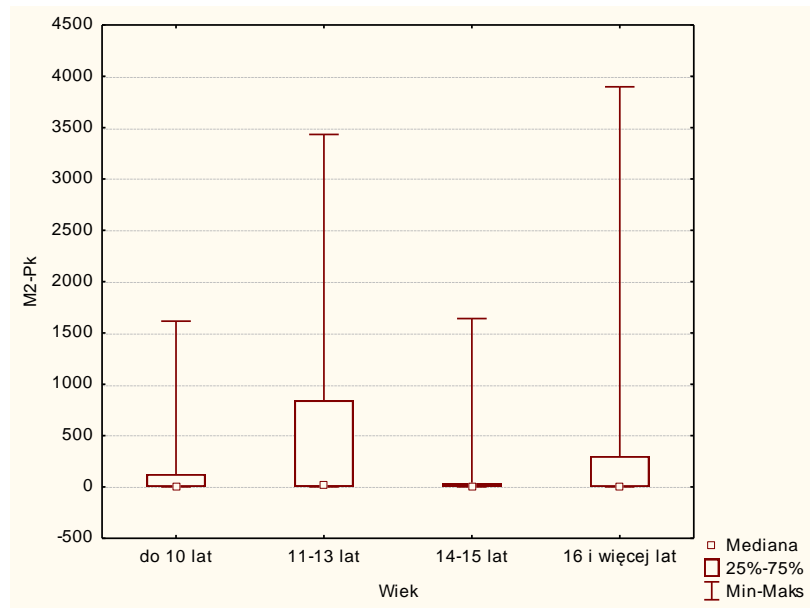
Na rycinie 7 przedstawiono rozkład stężenia laktoferyny w grupie chłopców i dziewczynek. W grupie chłopców stężenie markera mieściło się w zakresie od 0,27 – 957,74, natomiast u dziewczynek 0,34 – 1132,84 ug/ml. Stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w stężeniu laktoferyny w zależności od płci ($p=0,02$). U dziewczynek średnie stężenie markera jest wyraźnie niższe aniżeli w grupie chłopców (198,36 vs. 359,96).



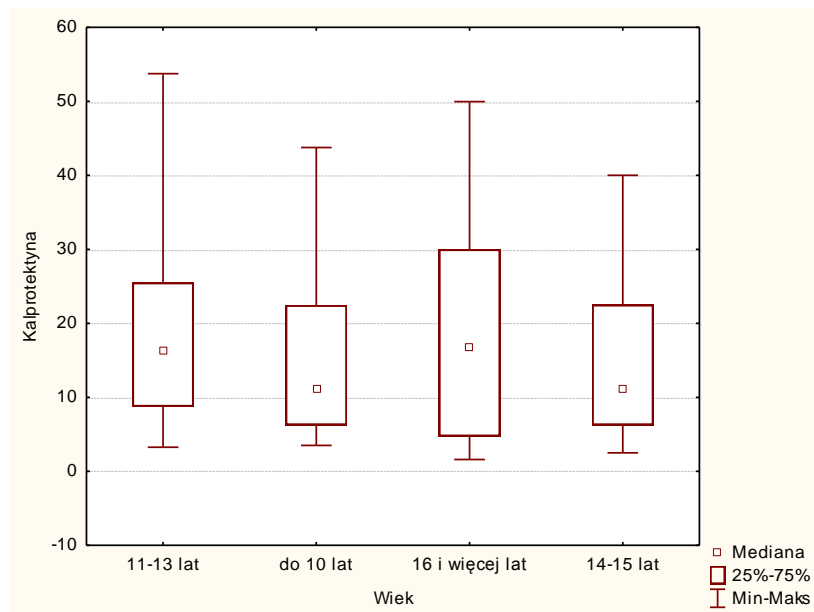
Rycina 7. Stężenie laktoferyny w kale w zależności od płci

- Rozkład stężenia markerów w zależności od wieku

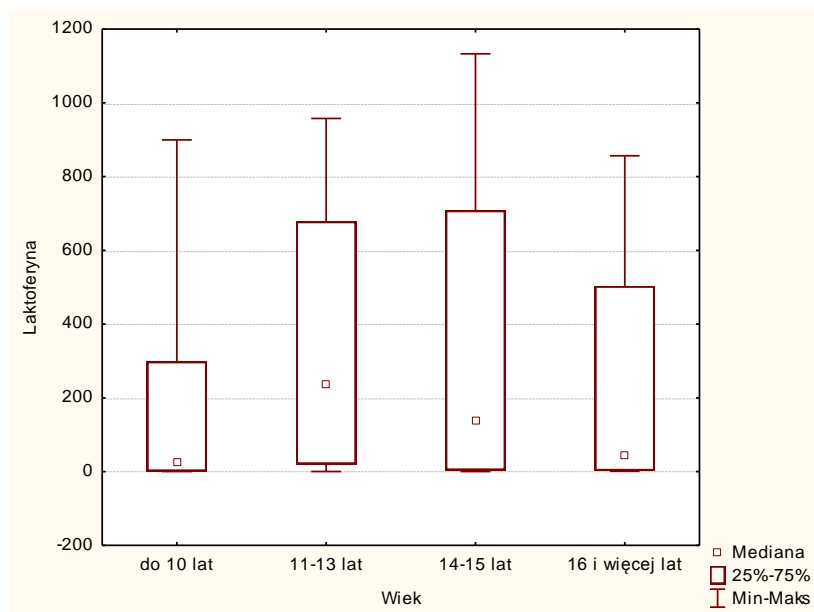
Postanowiono ocenić występowanie korelacji pomiędzy stężeniem badanych markerów a wiekiem dzieci z grupy badanej. Na rycinach 8,9 i 10 przedstawiono rozkład stężenia markerów w poszczególnych grupach wiekowych w grupie badanej.



Rycina 8. Rozkład aktywności M2-PK w poszczególnych grupach wiekowych



Rycina 9. Rozkład stężenia kalprotektyny w poszczególnych grupach wiekowych



Rycina 10. Rozkład stężenia laktoferyny w poszczególnych grupach wiekowych

Nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami w odniesieniu do żadnego markera. W tabeli 8 przedstawiono wartości współczynników korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem markerów zapalnych.

Tabela 8. Współczynnik korelacji R Spearmana dla wieku pacjentów i markerów stanu zapalnego

Rodzaj korelacji	N - Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & Wiek	108	-0,056	-0,578	0,5642
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Wiek	107	0,081	0,835	0,4053
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Wiek	106	0,020	0,208	0,8354

- Rozkład stężenia/aktywności markerów w zależności od rozpoznania

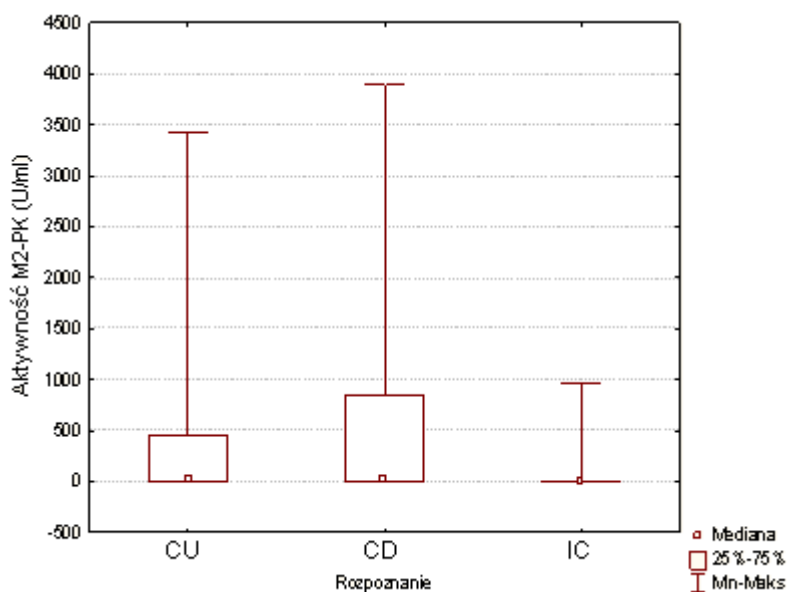
Analizowano czy występują różnice w obserwowanym poziomie markerów w kale a rozpoznaniem chorobowym (CU, CD, IC) (Tabela 9).

- M2-PK

W tabeli 6 przedstawiono dokładne poziomy aktywności M2-PK w poszczególnych jednostkach chorobowych. Porównanie aktywności markera u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC) przedstawiono na rycinie 11.

Tabela 9. Poziom aktywności M2-PK w poszczególnych jednostkach chorobowych

Rozpoznanie	Aktywność M2-PK (U/ml)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	37	405,80	809,12	1,00	3433,80	1,92	16,65	461,46
CD	47	462,59	800,19	1,00	3897,80	1,89	17,23	846,25
IC	24	42,85	195,75	1,00	961,58	1,00	1,00	2,14
Ogółem	108	349,86	729,09	1,00	3897,80	1,00	6,74	246,17



Rycina 11. Aktywność M2-PK u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC).

Wykazano istotną statystycznie różnicę w aktywności markera pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego a colitis indeterminata ($p = 0,00$). Identyczną

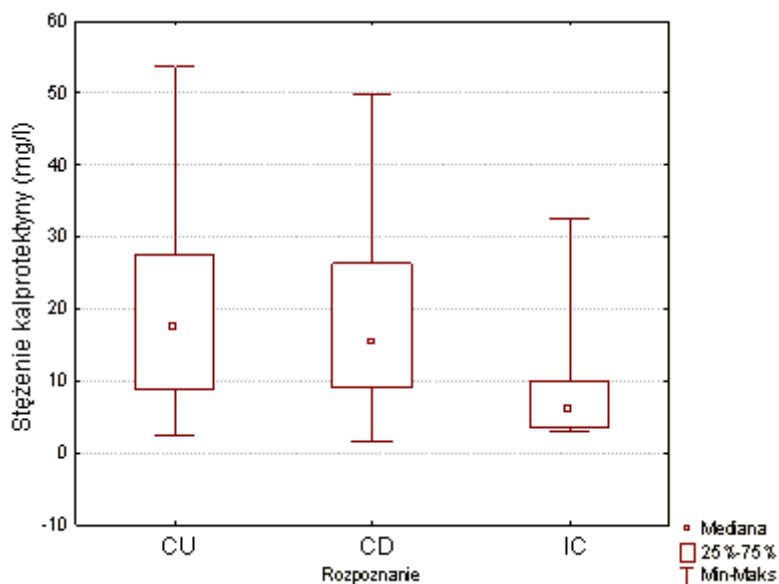
różnice obserwowano pomiędzy chorobą Leśniowskiego – Crohna a colitis indeterminata. Nie obserwowano istotności pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego – Crohna ($p=1,00$).

- Kalprotektyna

W tabeli 10 przedstawiono dokładne wartości stężenia kalprotektyny w poszczególnych jednostkach chorobowych. Porównanie wartości stężenia markera u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC) przedstawiono na rycinie 12.

Tabela 10. Wartości stężenia kalprotektyny w poszczególnych jednostkach chorobowych

Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
Rozpoznanie	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	37	12,90	2,50	53,75	8,75	17,50	27,50
CD	47	11,02	1,60	49,96	8,99	15,52	26,29
IC	23	6,82	2,86	32,50	3,50	6,00	10,00
Ogółem	107	11,78	1,60	53,75	6,25	13,75	25,50



Rycina 12. Stężenia kalprotektyny u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC).

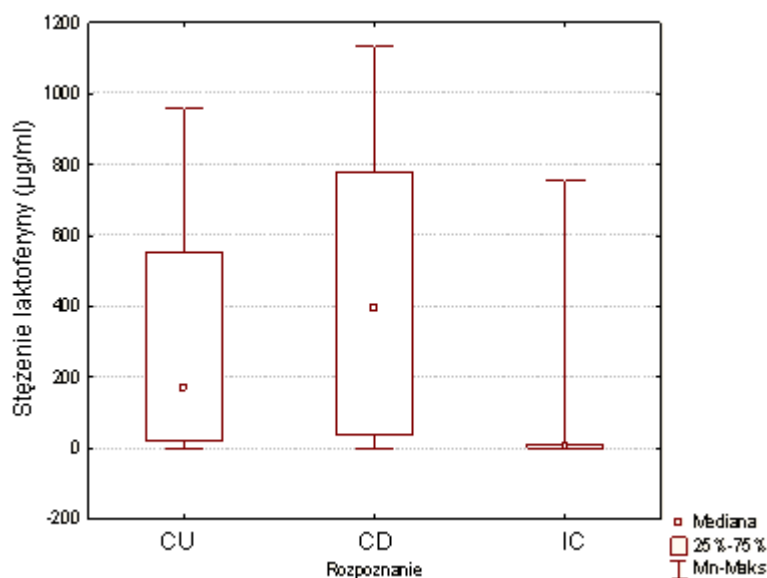
Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu markera pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego a colitis indeterminata ($p = 0,00$). Identyczną różnicę obserwowano pomiędzy chorobą Leśniowskiego – Crohna a colitis indeterminata. Nie obserwowano istotności pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego – Crohna ($p=1,00$).

- Laktoferyna

W tabeli 11 przedstawiono dokładne wartości stężenia laktoferyny w poszczególnych jednostkach chorobowych. Porównanie wartości stężenia markera u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC) przedstawiono na rycinie 13.

Tabela 11. Wartości stężenia laktoferyny w poszczególnych jednostkach chorobowych

Stężenie laktoferyny (ug/ml)							
Rozpoznanie	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
CU	36	317,37	0,34	957,74	20,28	170,63	551,63
CD	46	359,50	0,64	1132,84	38,18	395,65	781,09
IC	24	154,79	0,27	755,33	0,77	1,89	8,45
Ogółem	106	338,72	0,27	1132,84	5,53	80,40	566,03



Rycina 13. Stężenia laktoferyny u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego – Crohna (CD) oraz colitis indeterminata (IC).

Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu markera pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego a colitis indeterminata ($p = 0,00$). Identyczną różnicę obserwowano pomiędzy chorobą Leśniowskiego – Crohna a colitis indeterminata. Nie obserwowano istotności pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego – Crohna (0,88).

Wykazano istnienie wyraźnych zależności w poziomie wszystkich 3 markerów jedynie pomiędzy colitis indeterminata a wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz chorobą Leśniowskiego – Crohna. Parametry te nie mogą więc być pomocne w postawieniu dokładnego rozpoznania różnicującego postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit.

- Rozkład poziomu markerów w zależności od czasu rozpoznania choroby

Postanowiono określić czy istnieje zależność pomiędzy poziomem markerów stanu zapalnego w kale pacjenta a czasem od rozpoznania choroby

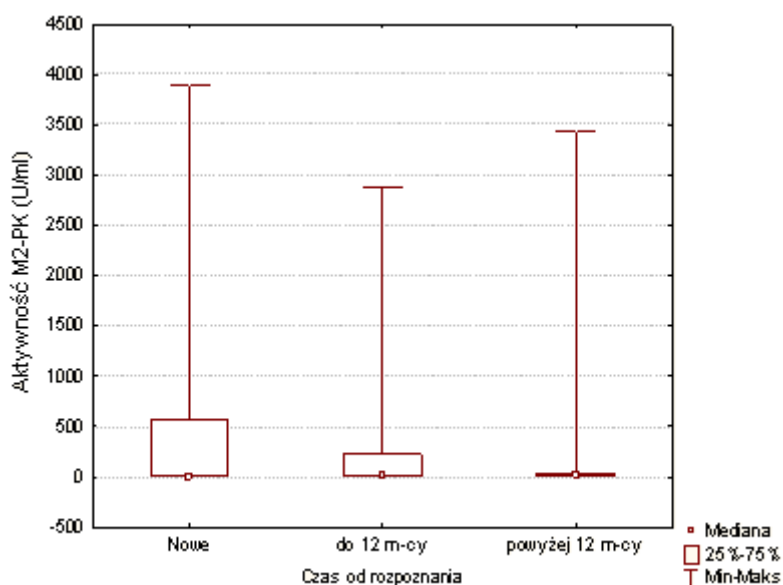
M2-PK

W tabeli 12 przedstawiono dokładne wartości aktywności M2-PK w zależności od czasu rozpoznania nieswoistej choroby zapalnej jelit. Porównanie wartości aktywności

markera u dzieci z nowym rozpoznaniem, czasem od rozpoznania nie dłuższym niż rok oraz powyżej roku przedstawiono na rycinie 14.

Tabela 12. Poziom aktywności M2-PK w zależności od czasu rozpoznania

Czas od rozpoznania choroby	Aktywność M2-PK (U/ml)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
nowe	51	380,33	778,26	1,00	3897,80	1,00	2,56	564,81
do 12 m-cy	30	313,61	653,78	1,00	2875,60	1,16	7,52	226,34
powyżej 12 m-cy	25	286,40	734,76	1,00	3433,80	1,92	9,89	34,98
Ogółem	106	339,29	729,07	1,00	3897,80	1,00	6,33	226,34



Rycina 14. Poziom aktywności M2-PK w zależności od czasu rozpoznania choroby.

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy czasem od postawienia diagnozy a aktywnością M2-PK w kale pacjentów ($p=0,3866$).

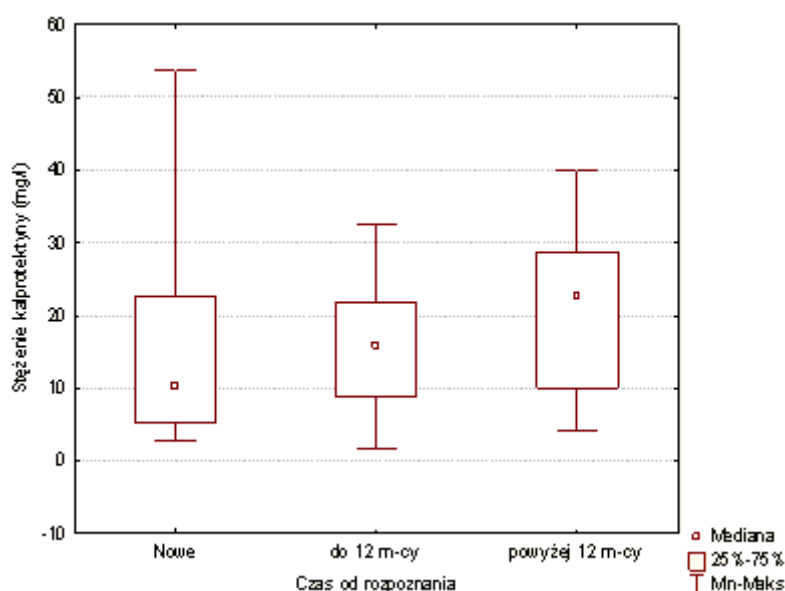
- Kalprotektyna

W tabeli 13 przedstawiono dokładne wartości stężenia kalprotektyny w zależności od czasu rozpoznania nieswoistej choroby zapalnej jelit. Porównanie wartości stężenia markera u

dzieci z nowym rozpoznaniem, czasem od rozpoznania nie dłuższym niż rok oraz powyżej roku przedstawiono na rycinie 15.

Tabela 13. Wartości stężenia kalprotektyny w zależności od czasu rozpoznania

Czas od rozpoznania choroby	Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
nowe	50	15,15	13,17	2,86	53,75	5,21	10,34	22,50
do 12 m-cy	30	15,71	8,65	1,60	32,50	8,75	15,89	21,83
powyżej 12 m-cy	25	20,59	11,92	4,12	40,00	10,00	22,50	28,75
Ogółem	105	16,61	11,85	1,60	53,75	6,25	13,75	24,80



Rycina 15. Wartości stężenia kalprotektyny w zależności od czasu rozpoznania choroby.

Wykazano istotne statystycznie zależności pomiędzy czasem od postawienia diagnozy a stężeniem kalprotektyny w kale pacjentów ($p=0,0237$). Dodatnia wartość współczynnika R Spearmana (0,221) świadczy, że zależność pomiędzy zmiennymi jest wprost proporcjonalna – im dłuższy czas od postawienia diagnozy tym wyższe stężenie markera w kale pacjentów pediatrycznych. Należy jednak zauważyć, że analizowana zależność jest stosunkowo słaba.

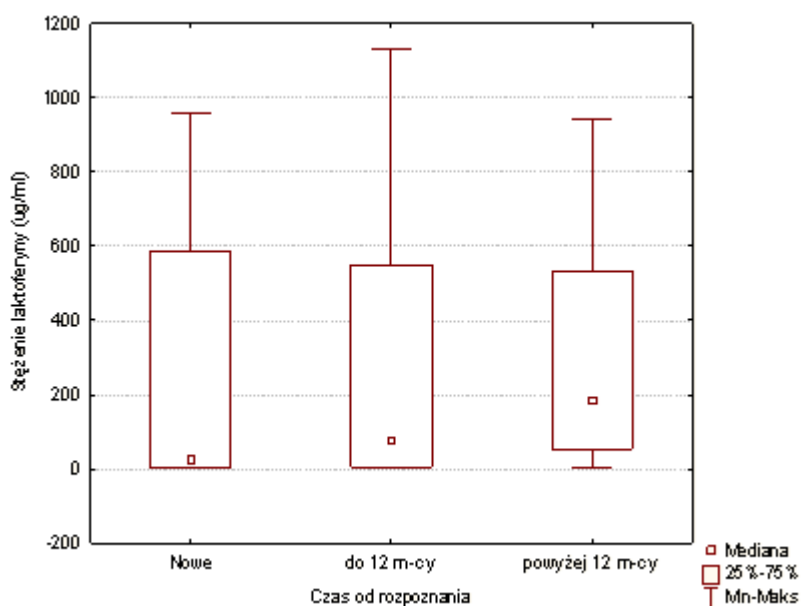
Obserwowana prawidłowość powinna być jednak uwzględniana w interpretacji stężenia markera w trakcie nieinwazyjnej diagnostyki stanu aktywności choroby u dzieci.

- Laktoferyna

W tabeli 14 przedstawiono dokładne wartości stężenia laktoferyny w zależności od czasu rozpoznania nieswoistej choroby zapalnej jelit. Porównanie wartości stężenia markera u dzieci z nowym rozpoznaniem, czasem od rozpoznania nie dłuższym niż rok oraz powyżej roku przedstawiono na rycinie 16.

Tabela 14. Wartości stężenia laktoferyny w zależności od czasu rozpoznania

Czas od rozpoznania choroby	Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
nowe	50	257,76	337,33	0,27	957,74	2,29	27,01	587,09
do 12 m-cy	30	298,68	360,20	0,34	1132,84	4,85	74,27	550,33
powyżej 12 m-cy	24	317,93	313,37	1,82	944,63	53,72	181,70	534,78
Ogółem	104	283,45	336,54	0,27	1132,84	5,19	76,74	551,63



Rycina 16. Wartości stężenia laktoferyny w zależności od czasu rozpoznania choroby.

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem laktoferyny w kale pacjentów a czasem od postawienia diagnozy (0,0733)

- Rozkład stężenia markerów w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Podjęto próbę określenia ewentualnej korelacji pomiędzy stężeniem markerów stanu zapalnego w kale, a oznaczonym stopniem aktywności klinicznej choroby.

Dokładny rozkład liczby pacjentów w poszczególnych stopniach aktywności klinicznej przedstawia tabela 15.

Tabela 15. Liczebność pacjentów w poszczególnych stopniach aktywności klinicznej choroby (bez grupy IC)

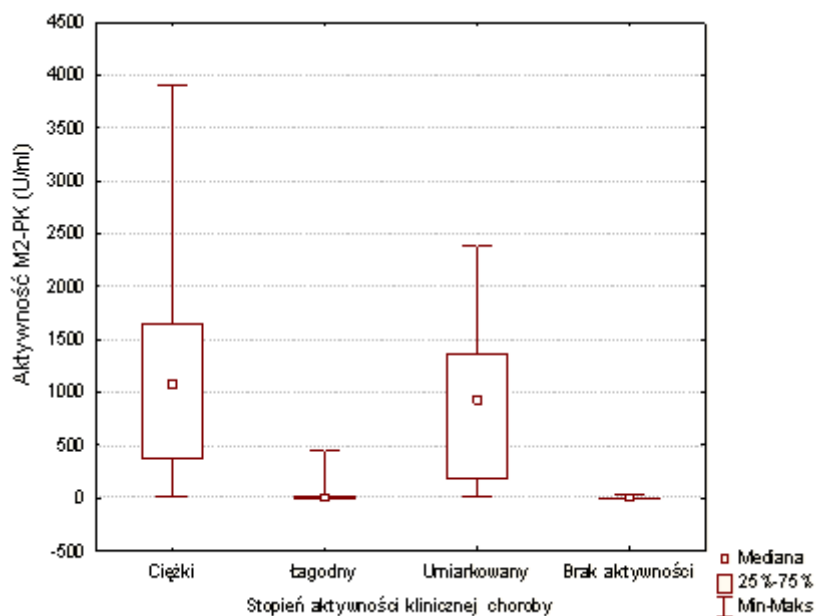
Rozpoznanie	Stopień aktywności klinicznej choroby				Razem
	brak aktywności	łagodny	umiarkowany	ciężki	
CU	0	20	9	8	37
CD	18	9	12	8	47
Razem	18	29	21	16	84

U znacznej części grupy badanej poziomy markerów w kale były podwyższone znacznie ponad normę. Fizjologiczny poziom M2-PK obserwowany był jedynie u 17 pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna, 11 z colitis ulcerosa oraz 21 z colitis indeterminata. Prawidłowe stężenie kalprotektyny wykryto u 23 dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna, 15 z colitis ulcerosa oraz 20 z colitis indeterminata. Stężenie laktoferyny nie była podwyższone u 7 dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna, 7 z colitis ulcerosa oraz 17 z colitis indeterminata.

Dokładne wartości stężenia poszczególnych markerów w kale pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna, w zależności od stopnia aktywności choroby, przedstawiają tabele 16, 17, 18 oraz ryciny 17,18 i 19.

Tabela 16. Aktywność M2-PK w kale dzieci z choroba Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

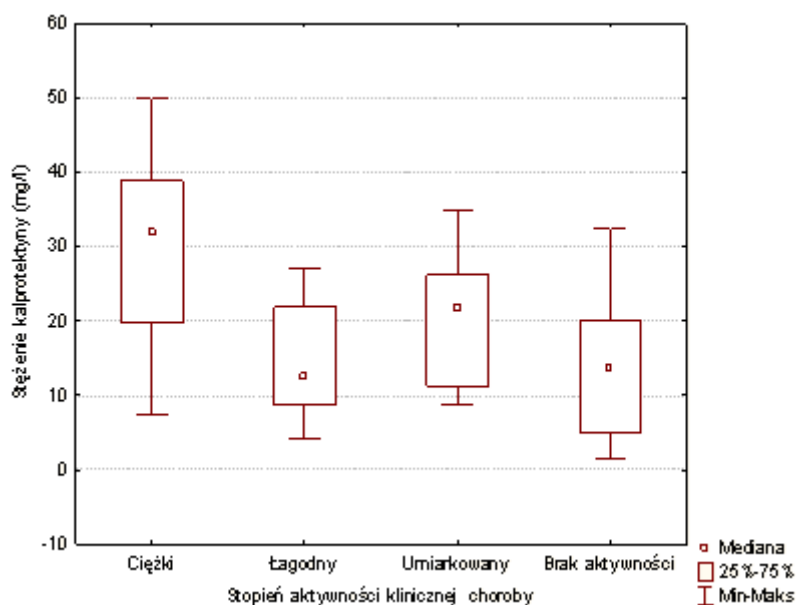
Stopień aktywności klinicznej choroby	Aktywność M2-PK (U/ml)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Brak aktywności	18	5,42	9,81	1,00	32,47	1,00	1,14	3,18
Łagodny	9	53,37	138,71	1,37	447,73	2,56	12,17	17,23
Umiarkowany	12	1013,76	721,78	125,82	2384,80	226,34	1037,64	1371,94
Ciężki	8	1219,20	1170,67	19,54	3897,80	746,06	958,69	1393,10
Ogółem	47	462,59	800,19	1,00	3897,80	1,89	17,23	846,25



Rycina 17. Aktywność M2-PK w kale dzieci z choroba Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Tabela 17. Stężenie kalprotektyny w kale dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

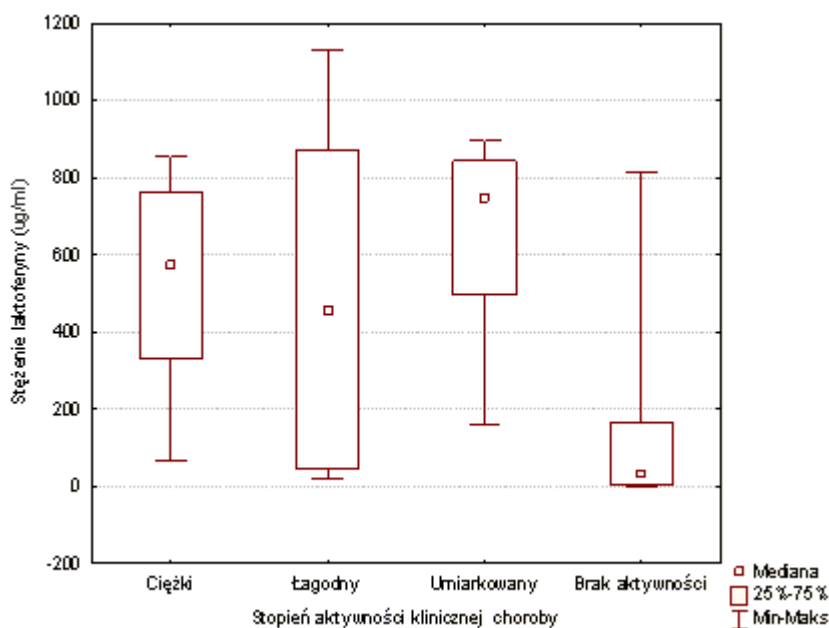
Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
Stopień aktywności klinicznej choroby	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Brak aktywności	18	8,80	1,60	32,50	5,00	13,62	20,00
Łagodny	9	7,91	4,20	27,09	8,75	11,25	21,92
Umiarkowany	12	8,48	8,75	35,00	12,50	21,73	26,18
Ciężki	8	13,42	7,50	49,96	26,81	31,25	33,98
Ogółem	47	11,02	1,60	49,96	8,99	15,52	26,29



Rycina 18. Stężenie kalprotektyny w kale dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Tabela 18. Stężenie laktoferyny w kale dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Stężenie laktoferyny (ug/ml)							
Stopień aktywności klinicznej choroby	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Brak aktywności	18	278,30	0,64	815,03	2,25	35,73	164,32
Łagodny	9	411,68	20,72	1132,84	66,65	489,06	793,19
Umiarkowany	11	255,23	162,79	898,52	505,91	750,81	847,92
Ciężki	8	281,28	67,81	856,38	366,51	708,11	781,09
Ogółem	46	359,50	0,64	1132,84	38,18	395,65	781,09



Rycina 19. Stężenie laktoferyny w kale dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Analiza poziomu oznaczanych markerów w kale prowadzona z uwzględnieniem stopnia aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego - Crohna u chorych dzieci wskazuje na występowanie istotnej statystycznie zależności pomiędzy tymi zmiennymi. Istotna statystycznie korelacja występuje zarówno pomiędzy nasileniem choroby według skali PDAI a poziomem markera M2-PK, jak i stężeniem pozostałych markerów, przy

czym najsilniejszą korelację obserwuje się właśnie pomiędzy nasileniem choroby a poziomem M2-PK ($R=0,82$). Wartości współczynnika R Spearmana oraz odpowiadające im poziomy istotności statystycznej p przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Wartości współczynnika korelacji rang R Spearmana oraz poziomy istotności statystycznej p dla korelacji aktywności klinicznej choroby z poziomem aktywności/stężenia markera w kale

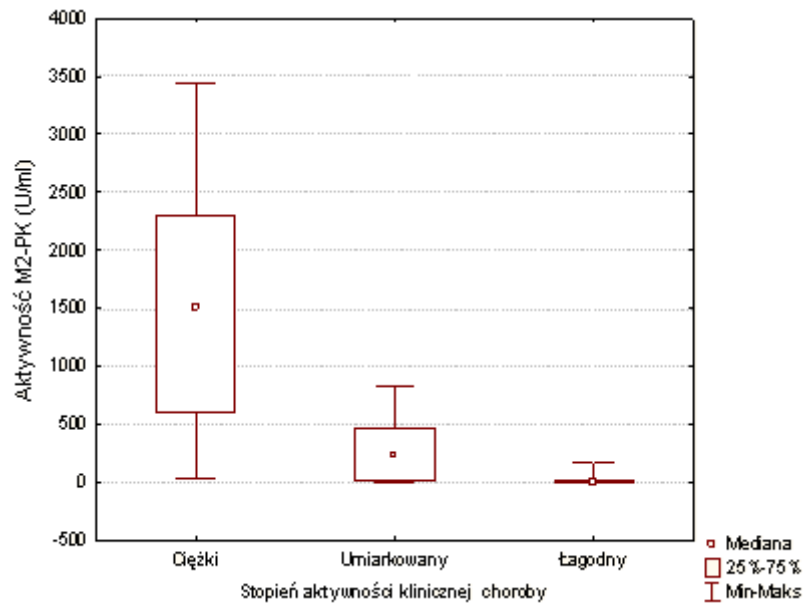
Choroba Leśniowskiego - Crohna	N	R	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & Stopień aktywności klinicznej choroby	47	0,820	9,621	0,000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Stopień aktywności klinicznej choroby	47	0,403	2,951	0,005
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Stopień aktywności klinicznej choroby	46	0,534	4,185	0,000

współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$

Dokładne wartości poziomu poszczególnych markerów w kale pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przedstawiają tabele 20,21,22 oraz ryciny 20,21 i 22.

Tabela 20. Aktywność M2-PK w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

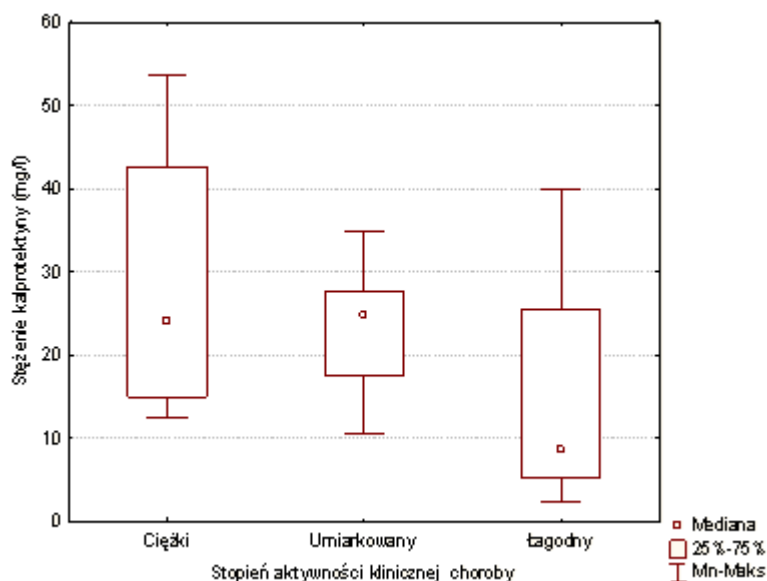
Stopień aktywności klinicznej choroby	Aktywność M2-PK (U/ml)							
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Łagodny	20	18,96	39,53	1,00	171,64	1,00	3,21	18,55
Umiarkowany	9	265,63	298,11	1,00	819,00	11,96	230,58	461,46
Ciężki	8	1530,59	1167,21	17,44	3433,80	596,88	1506,17	2293,70
Ogółem	37	405,80	809,12	1,00	3433,80	1,92	16,65	461,46



Rycina 20. Aktywność M2-PK w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Tabela 21. Stężenie kalprotektyny w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

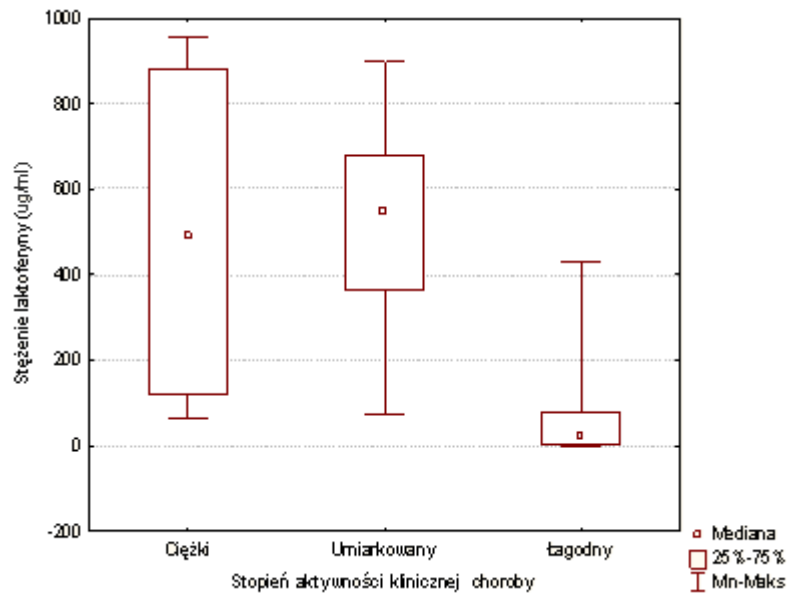
Stężenie kalprotektyny (mg/l)							
Stopień aktywności klinicznej choroby	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Łagodny	20	11,27	2,50	40,00	5,46	10,71	23,35
Umiarkowany	9	9,56	6,25	35,00	14,82	24,80	27,73
Ciężki	8	14,42	13,75	53,75	19,38	25,09	42,64
Ogółem	37	12,90	2,50	53,75	8,75	17,50	27,50



Rycina 21. Stężenie kalprotektyny w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Tabela 22. Stężenie laktoferyny w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Stężenie laktoferyny (ug/ml)							
Stopień aktywności klinicznej choroby	N	Odch.std	Minimum	Maksimum	Q25	Mediana	Q75
Łagodny	19	141,06	0,34	431,49	6,59	31,66	199,07
Umiarkowany	9	294,31	2,14	899,34	312,17	550,33	678,15
Ciężki	8	352,03	98,23	957,74	207,13	672,71	878,82
Ogółem	36	317,37	0,34	957,74	20,28	170,63	551,63



Rycina 22. Stężenie laktoferyny w kale dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Z przeprowadzonej analizy wynika, że występuje istotna statystycznie zależność pomiędzy poziomem oznaczanych markerów w kale a stopniem aktywności klinicznej wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u chorych dzieci wyrażonym w skali PCDAI (tabela 23).

Tabela 23. Wartości współczynnika R Spearmana oraz odpowiadające im poziomy istotności statystycznej p w badaniu zależności aktywności klinicznej choroby z poziomem aktywności/stężenia markera w kale

Colitis ulcerosa	N	R	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & Stopień aktywności klinicznej choroby	36	0,772	7,091	0,000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Stopień aktywności klinicznej choroby	36	0,474	3,137	0,004
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Stopień aktywności klinicznej choroby	35	0,689	5,458	0,000

*współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$

Stosując test porównań wielokrotnych Kruskala-Wallisa oceniono pomiędzy którymi stadiami aktywności klinicznej choroby występują istotne statystycznie różnice w poziomie badanych markerów.

Choroba Leśniowskiego – Crohna

Przeprowadzona analiza wykazała, że poziomem markerów istotnie statystycznie różnią się następujące grupy pacjentów:

a) M2-PK

- u których stwierdzono brak aktywności choroby oraz w stadium umiarkowanym choroby ($p = 0,00$)
- u których stwierdzono brak aktywności choroby oraz w stadium ciężkim choroby ($p = 0,00$)
- w stadium łagodnym oraz umiarkowanym choroby ($p = 0,032$)

b) Kalprotektyna - z brakiem aktywności choroby oraz w stadium ciężkim choroby ($p = 0,02$)

c) Laktoferyna:

- z brakiem aktywności choroby oraz w stadium umiarkowanym choroby ($p = 0,002$)
- z brakiem aktywności choroby oraz w stadium ciężkim choroby ($p = 0,026$)

Uzyskane wyniki wskazują, iż najlepszym markerem dla oceny stadium aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego – Crohna jest M2-PK.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

a) M2-PK - w stadium łagodnym oraz ciężkim choroby ($p = 0,00$)

b) Kalprotektyna - w stadium łagodnym oraz ciężkim choroby ($p = 0,031$)

c) Laktoferyna:

- w stadium łagodnym oraz ciężkim choroby ($p = 0,001$)
- w stadium łagodnym oraz umiarkowanym choroby ($p = 0,017$)

Uzyskane wyniki wskazują, iż najlepszym markerem dla oceny stadium aktywności klinicznej wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest laktoferyna.

Zależność pomiędzy poziomami oznaczanych markerów

Postanowiono określić występowanie ewentualnej korelacji pomiędzy poziomami badanych enzymów w kale pacjenta. Wykazano istotną statystycznie zależność: wraz ze zmianą poziomu jednego markera następował również wzrost kolejnych.

Tabela 24. Korelacje pomiędzy poziomem analizowanych markerów w kale.

Korelacje	N	R-Spearman	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & Stężenie kalprotektyny (mg/l)	107	0,60	7,71	0,000
Aktywność M2-PK (U/ml) & Stężenie laktoferyny (ug/ml)	106	0,78	12,79	0,000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Aktywność M2-PK (U/ml)	107	0,60	7,71	0,000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Stężenie laktoferyny (ug/ml)	105	0,58	7,29	0,000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Aktywność M2-PK (U/ml)	106	0,78	12,79	0,000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Stężenie kalprotektyny (mg/l)	105	0,58	7,29	0,000

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie silnej korelacji pomiędzy oznaczanymi w kale markerami.

- Rozkład aktywności/stężenia markerów zapalnych a wybrane parametry stanu zapalnego

Postanowiono określić występowanie ewentualnych zależności pomiędzy analizowanymi markerami stanu zapalnego, a klasycznymi parametrami zapalnymi oznaczanymi u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Analizowano korelację markerów stanu zapalnego z następującymi parametrami:

- stężenie białka C- reaktywnego w surowicy (CRP)
- odczyn opadania krwinek czerwonych (OB.)
- stężenie fibrynogenu w osoczu krwi (FIBR)
- liczbę płytek krwi w badaniu morfotycznym krwi (PLT)
- poziom żelaza we krwi (Fe)
- poziom hemoglobiny we krwi
- poziom białka całkowitego i albumin w osoczu
- oraz stężenie immunoglobuliny IgM, IgA, IgE i IgG w osoczu

W grupie dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wykazano wystąpienie istotnych statystycznie korelacji pomiędzy badanymi markerami stanu zapalnego, a wybranymi parametrami laboratoryjnymi, co kolejno przedstawiono w następujących tabelach: dla M2-PK tabela 25, dla kalprotektyny tabela 26, dla laktoferyny tabela 27.

Tabela 25. Korelacje pomiędzy poziomem M2-PK a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego

KORELACJA	N	R Spearman	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & WSKAŹNIK COLE'A (%)	107	-0,353	-3,868	0,0002
Aktywność M2-PK (U/ml) & CRP (mg/dl)	108	0,510	6,110	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & OB (mm/H)	108	0,575	7,245	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & FIBR (mg/dl)	105	0,510	6,024	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & HGB (g/dl)	108	-0,549	-6,760	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & PLT (*103ul)	108	0,510	6,101	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & Fe	79	-0,448	-4,391	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & ALBUMINY (%)	104	-0,474	-5,436	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & BIAŁKO CAŁKOWITE (g/d)	103	-0,280	-2,934	0,0041

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy aktywnością M2-PK a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy aktywnością M2-PK a wskaźnikiem odżywienia Cole'a, poziomem hemoglobiny i żelaza we krwi, poziomem albumin i białka całkowitego w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

Tabela 26. Korelacje pomiędzy poziomem kalprotektyny a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego

KORELACJA	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & CRP	107	0,405	4,538	0,0000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & OB (mm/H)	107	0,435	4,946	0,0000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & FIBR (mg/dl)	104	0,433	4,853	0,0000
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & HGB (g/dl)	107	-0,355	-3,887	0,0002
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & PLT (*103ul)	107	0,359	3,940	0,0001
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & Fe	78	-0,270	-2,449	0,0166
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & ALBUMINY (%)	103	-0,290	-3,047	0,0029

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a poziomem hemoglobiny i żelaza we krwi oraz poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

Tabela 27. Korelacje pomiędzy stężeniem laktoferyny a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego

KORELACJA	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & WSKAŹNIK COLE'A (%)	105	-0,344	-3,715	0,0003
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & CRP (mg/dl)	106	0,579	7,243	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & OB (mm/H)	106	0,607	7,796	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & FIBR (mg/dl)	103	0,593	7,411	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & HGB (g/dl)	106	-0,520	-6,204	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & PLT (*103ul)	106	0,452	5,171	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Fe	77	-0,528	-5,380	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & IgM	85	-0,251	-2,367	0,0202
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & ALBUMINY (%)	102	-0,489	-5,610	0,0000

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a wskaźnikiem odżywienia Cole'a, poziomem hemoglobiny, żelaza, przeciwciał IgM we krwi oraz poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

Większość analizowanych markerów zapalnych dobrze koreluje z wybranymi parametrami laboratoryjnymi. Istnieje dodatnia zależność pomiędzy poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi, a wszystkimi trzema markerami. Istnieje ujemna zależność pomiędzy poziomem hemoglobiny i żelaza we krwi i poziomem albumin w osoczu, a wszystkimi trzema markerami. Zarówno aktywność M2PK jak i stężenie laktoferyny dobrze korelują ze wskaźnikiem odżywienia Cole'a, ponad to aktywność M2-PK dobrze koreluje z poziomem białka całkowitego w osoczu, natomiast stężenie laktoferyny z mianem przeciwciał IgM we krwi.

Postanowiono jednocześnie sprawdzić występowanie korelacji pomiędzy wymienionymi parametrami stanu zapalnego a badanymi markerami w poszczególnych jednostkach chorobowych.

- Korelacje pomiędzy rodzajem nieswoistej choroby zapalnej jelit, a markerami procesu zapalnego i wybranymi parametrami laboratoryjnymi.

W grupie dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wykazano wystąpienie istotnych statystycznie korelacji pomiędzy badanymi markerami stanu zapalnego, a wybranymi parametrami laboratoryjnymi. Kolejno przedstawiono to w grupach chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i colitis indeterminata oraz w układzie odpowiednio dla: M2-PK, dla kalprotektyny, dla laktoferyny, w każdej grupie chorych. Wyniki szczegółowe zawarte są w tabelach od 28-33 oraz na s. 69.

- Choroba Leśniowskiego – Crohna
Analiza statystyczna wykazała występowanie następujących korelacji, odpowiednio w zakresie kolejnych markerów procesu zapalnego jelit:
- M2-PK

Tabela 28. Korelacje pomiędzy aktywnością M2-PK a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego w chorobie Leśniowskiego - Crohna

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & WSKAŹNIK COLE'A (%)	46	-0,514	-3,974	0,0003
Aktywność M2-PK (U/ml) & CRP (mg/dl)	47	0,529	4,180	0,0001
Aktywność M2-PK (U/ml) & OB (mm/H)	47	0,545	4,364	0,0001
Aktywność M2-PK (U/ml) & FIBR (mg/dl)	47	0,396	2,889	0,0059
Aktywność M2-PK (U/ml) & HGB (g/dl)	47	-0,520	-4,086	0,0002
Aktywność M2-PK (U/ml) & PLT (*103ul)	47	0,480	3,672	0,0006
Aktywność M2-PK (U/ml) & ALBUMINY (%)	47	-0,459	-3,461	0,0012
Aktywność M2-PK (U/ml) & BIAŁKO CAŁKOWITE (g/d)	47	-0,307	-2,162	0,0360

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy aktywnością M2-PK a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem aktywności markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy aktywnością M2-PK, a wskaźnikiem odżywienia Cole'a, poziomem hemoglobiny we krwi, poziomem albumin i białka całkowitego w osoczu. Wraz ze wzrostem aktywności markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Kalprotektyna

Tabela 29. Korelacje pomiędzy stężeniem kalprotektyny a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego w chorobie Leśniowskiego - Crohna

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & CRP (mg/dl)	47	0,356	2,557	0,0140
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & OB (mm/H)	47	0,327	2,324	0,0247
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & FIBR (mg/dl)	47	0,311	2,194	0,0334
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & HGB (g/dl)	47	-0,311	-2,196	0,0333
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & PLT (*103ul)	47	0,327	2,319	0,0250
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & ALBUMINY (%)	47	-0,336	-2,394	0,0209

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a poziomem hemoglobiny we krwi oraz poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Laktoferyna

Tabela 30. Korelacje pomiędzy stężeniem laktoferyny a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego w chorobie Leśniowskiego – Crohna

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie laktoferyny (ug/ml)&WSKAŹNIK ODŻYWIENIA COLE'A (%)	45	-0,567	4,509	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & CRP (mg/dl)	46	0,541	4,268	0,0001
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & OB (mm/H)	46	0,457	3,409	0,0014
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & FIBR (mg/dl)	46	0,398	2,875	0,0062
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & HGB (g/dl)	46	-0,460	3,435	0,0013
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & PLT (*103ul)	46	0,396	2,861	0,0064
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Fe	35	-0,378	2,345	0,0252
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & IgA	35	0,383	2,384	0,0231
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & ALBUMINY (%)	46	-0,474	3,573	0,0009

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi, liczbą płytek krwi oraz mianem przeciwciał IgA. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a wskaźnikiem odżywienia Cole'a, poziomem hemoglobiny i żelaza we krwi oraz poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Analiza statystyczna wykazała występowanie następujących korelacji, odpowiednio w zakresie kolejnych markerów procesu zapalnego jelit:

- M2-PK

Tabela 31. Korelacje pomiędzy aktywnością M2-PK a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Aktywność M2-PK (U/ml) & CRP (mg/dl)	37	0,493	3,354	0,0019
Aktywność M2-PK (U/ml) & OB (mm/H)	37	0,545	3,841	0,0005
Aktywność M2-PK (U/ml) & FIBR (mg/dl)	36	0,502	3,386	0,0018
Aktywność M2-PK (U/ml) & HGB (g/dl)	37	-0,671	-5,353	0,0000
Aktywność M2-PK (U/ml) & PLT (*103u)	37	0,518	3,579	0,0010
Aktywność M2-PK (U/ml) & Fe	29	-0,562	-3,527	0,0015
Aktywność M2-PK (U/ml) & ALBUMINY (%)	36	-0,420	-2,701	0,0107

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy aktywnością M2-PK, a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem aktywności markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy aktywnością M2-PK, a poziomem hemoglobiny i żelaza we krwi i poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem aktywności markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Kalprotektyna

Tabela 32. Korelacje pomiędzy stężeniem kalprotektyny, a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & OB (mm/H)	37	0,362	2,296	0,0278
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & FIBR (mg/dl)	36	0,490	3,277	0,0024
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & HGB (g/dl)	37	-0,449	-2,969	0,0054
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & IgA	33	-0,419	-2,571	0,0152
Stężenie kalprotektyny (mg/l) & IgE	31	-0,456	-2,760	0,0099

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny, a poziomem OB oraz fibrynogenu we krwi. Wraz ze wzrostem stężenie markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny, a poziomem hemoglobiny we krwi oraz poziomem przeciwciał IgA i IgE. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Laktoferyna

Tabela 33. Korelacje pomiędzy stężeniem laktoferyny, a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

KORELACJE	N	R Spearman	t(N-2)	p
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & CRP (mg/dl)	36	0,471	3,115	0,0037
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & OB (mm/H)	36	0,579	4,140	0,0002
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & FIBR (mg/dl)	35	0,596	4,268	0,0002
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & HGB (g/dl)	36	-0,644	-4,911	0,0000
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & PLT (*103ul)	36	0,424	2,731	0,0099
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & Fe	28	-0,578	-3,615	0,0013
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & IgE	30	-0,396	-2,283	0,0303
Stężenie laktoferyny (ug/ml) & ALBUMINY (%)	35	-0,368	-2,276	0,0295

Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a poziomem CRP, OB., fibrynogenu we krwi, liczbą płytek krwi. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje wzrost poziomu wspomnianych parametrów.

Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a poziomem hemoglobiny, żelaza we krwi, poziomem przeciwciał IgE oraz poziomem albumin w osoczu. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

- Colitis indeterminata

Analiza statystyczna wykazała występowanie następujących korelacji, odpowiednio w zakresie kolejnych markerów procesu zapalnego jelit:

- M2-PK

Nie wykazano żadnej korelacji pomiędzy aktywnością M2-PK w kale a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego we krwi.

- Kalprotektyna

Nie wykazano żadnej korelacji pomiędzy stężeniem kalprotektyny w kale a stężeniem wybranych parametrów stanu zapalnego we krwi.

- Laktoferyna

Zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny w kale, a poziomem żelaza we krwi oraz poziomem przeciwciał IgM. Wraz ze wzrostem stężenia markera następuje spadek poziomu wspomnianych parametrów.

Wykazano, że większość parametrów stanu zapalnego dobrze koreluje z poziomem oznaczanych markerów dla nieswoistych chorób zapalnych jelit. Rozróżniając poszczególne jednostki chorobowe zaobserwowano, iż u pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna dodatnią korelację w przypadku wszystkich trzech markerów obserwowano z CRP, OB., fibrynogenem we krwi oraz liczbą płytek krwi, natomiast w przypadku colitis ulcerosa z OB i fibrynogenem we krwi. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna korelację ujemną wszystkich trzech markerów obserwowano z hemoglobina we krwi oraz poziomem albumin w osoczu a u dzieci z colitis ulcerosa z poziomem hemoglobiny. W przypadku colitis indeterminata obserwowano nieliczne korelacje z parametrami stanu zapalnego.

2.1. Podsumowanie wyników w zakresie badanych markerów stanu zapalnego u dzieci z NZJ

- Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic wiekowych w grupie badanej.
- Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic w aktywności M2-PK i stężenia kalprotektyny w kale w zależności od płci.
- Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic w poziomie analizowanych markerów w kale w zależności od wieku.
- Średnie stężenie laktoferyny w kale było istotnie niższe w grupie dziewczynek.
- Poziom w zakresie normy M2-PK ($\leq 4U/ml$) oraz kalprotektyny ($15mg/l$) i laktoferyny ($7,24 mg/l$) obserwowano przede wszystkim u dzieci w łagodnym lub umiarkowanym stadium lub z brakiem aktywności choroby oraz u pacjentów z colitis indeterminata. U pozostałych pacjentów poziom markerów był najczęściej wyraźnie podwyższony.

- Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomach wszystkich analizowanych markerów w kale pomiędzy pacjentami z colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna a dziećmi z colitis indeterminata. Brak tej istotności obserwowano pomiędzy colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna.
- Zaobserwowano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a czasem od postawienia diagnozy. Nie obserwowano podobnej korelacji w przypadku M2-PK oraz laktoferyny.
- Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomami wszystkich badanych markerów w kale a stadiem aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego – Crohna oraz colitis ulcerosa u dzieci.
- Najlepszym markerem dla oceny stopnia aktywności choroby Leśniowskiego - Crohna wydaje się być M2-PK. Istotną statystycznie różnicę w aktywności markera w kale obserwowano pomiędzy pacjentami z brakiem nasilenia choroby a dziećmi w stanie umiarkowanym i ciężkim choroby, jak również oraz pomiędzy pacjentami w stanie łagodnym a umiarkowanym
- Najlepszym markerem dla oceny stopnia aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wydaje się być laktoferyna. Stężenie markera różni się w sposób istotny statystycznie u pacjentów w łagodnym stadium choroby a dziećmi w stadium umiarkowanym i ciężkim.
- Zaobserwowano istnienie silnej korelacji pomiędzy poziomami oznaczanych markerów w kale. Wzrost stężenia/aktywności jednego z markerów korelował dodatnio ze wzrostem poziomów pozostałych markerów.
- Wykazano istnienie silnej dodatniej korelacji pomiędzy poziomem CRP, OB, fibrynogenu we krwi i liczbą płytek krwi a poziomami wszystkich oznaczanych markerów w kale.
- Silną ujemną zależność zaobserwowano pomiędzy stężeniem/aktywnością poszczególnych markerów, a poziomem hemoglobiny, żelaza we krwi i poziomem albumin w osoczu u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Wraz ze wzrostem poziomu tych parametrów, maleje stężenie/aktywność wszystkich trzech oznaczanych markerów. M2-PK i laktoferyna korelują ujemnie ze wskaźnikiem odżywienia Cole'a.
- U pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna wykazano wystąpienie dodatniej korelacji pomiędzy poziomem oznaczanych markerów, a wartością CRP, OB,

fibrynogenu i płytek krwi, a ujemnej z poziomem hemoglobiny i albumin w osoczu. M2-PK i laktoferyna korelują ujemnie ze wskaźnikiem odżywienia Cole'a.

- U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy poziomem markerów oznaczanych w kale a wartościami OB i fibrynogenu we krwi, a ujemną - z poziomem hemoglobiny oraz albumin w osoczu.
- U dzieci z colitis indeterminata obserwowano jedynie nieliczne korelacje poziomu markerów w kale z wartościami parametrów stanu zapalnego we krwi.

3. Charakterystyka wybranych grup mikroorganizmów jelitowych u dzieci z NZJ

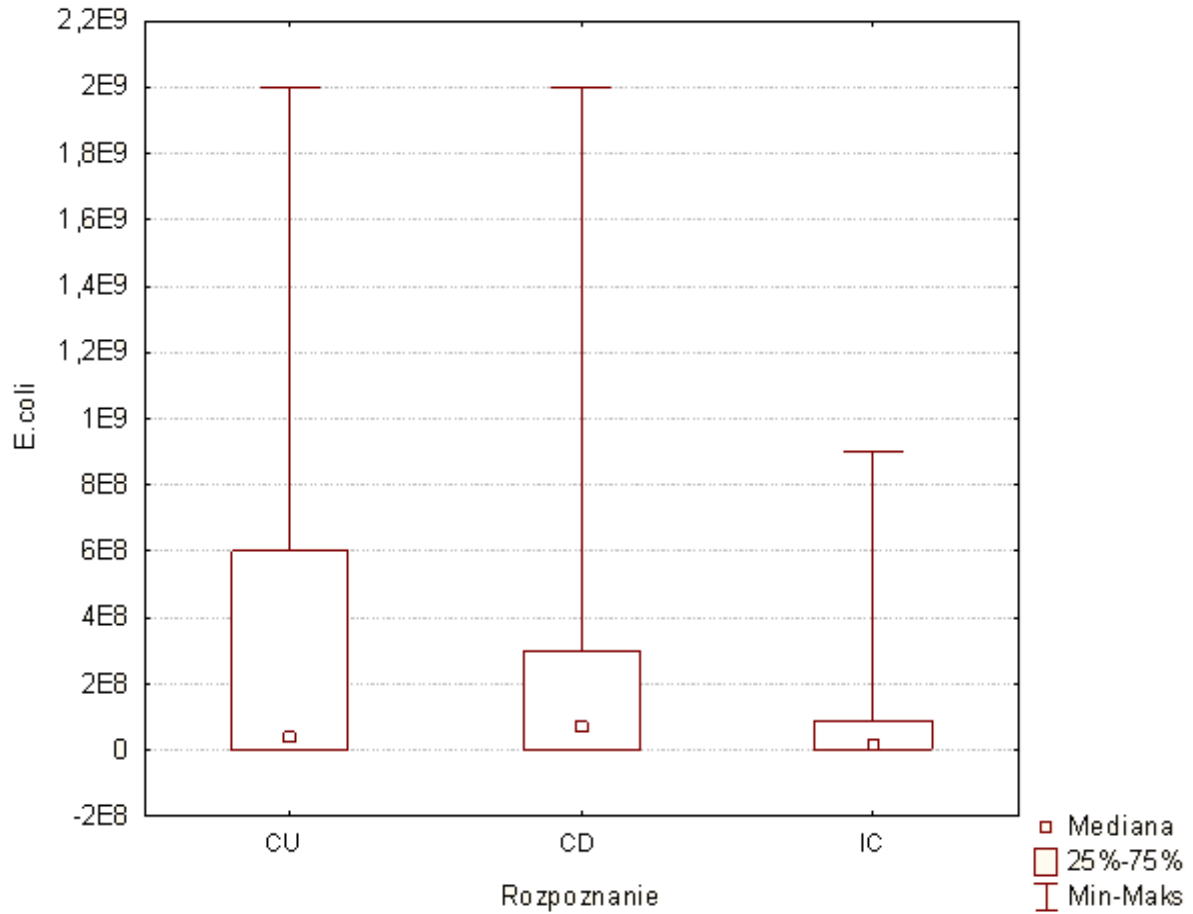
- Liczebność poszczególnych drobnoustrojów w zależności od rodzaju jednostki chorobowej

Postanowiono określić czy u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit liczebność poszczególnych bakterii mieści się w normie fizjologicznej. Działanie takie miało na celu opracowanie charakterystyki występowania wybranych drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym chorych dzieci.

Ponieważ wykazano, iż odchylenie standardowe jest wyraźnie wyższe od średniej (znaczna liczba przypadków obserwacji odstających) postanowiono posłużyć się medianą jako miarą statystyki opisowej dla grupy badanych dzieci.

Escherichia coli.

Norma liczebności bakterii z gatunku *Escherichia coli* w kale to $\geq 10^6$ CFU.



Rycina 23. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii *Escherichia coli* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 34. Liczebność drobnoustrojów z rodzaju *E.coli* w kale dzieci z grupy badanej

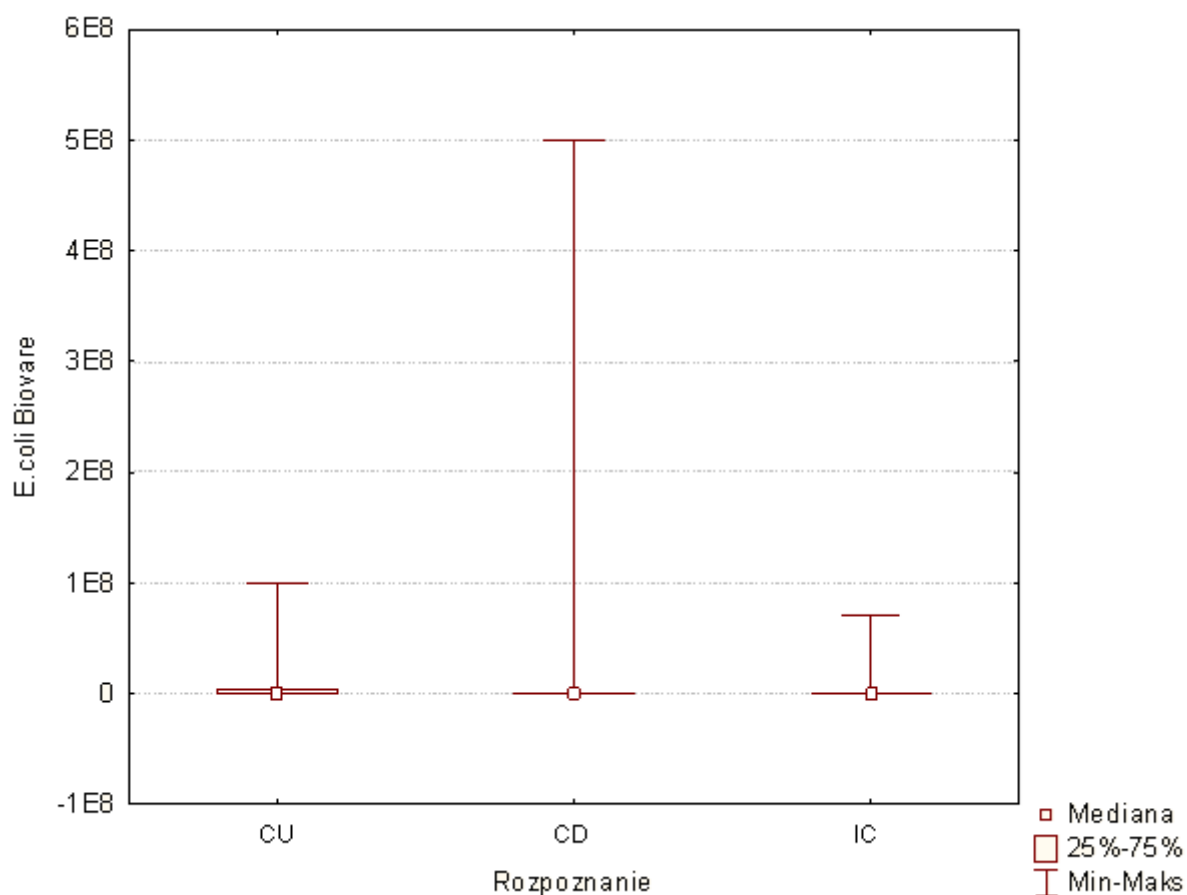
Jednostka chorobowa	<i>E.coli</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	165 480 000	296 524 653	20 000	900 000 000	20 000 000
CU	35	273 346 857	420 252 352	20 000	2 000 000 000	40 000 000
CD	43	206 310 233	365 384 739	20 000	2 000 000 000	70 000 000
Ogółem (NZJ)	100	220 790 400	371 068 912	20 000	2 000 000 000	40 000 000

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych mediana liczebności opisywanych bakterii mieściła się w zakresie normy:

$$CU - 4 \times 10^7 \text{ CFU} \quad CD - 7 \times 10^7 \text{ CFU} \quad IC - 2 \times 10^7 \text{ CFU}$$

Śluzowe, laktozo - ujemne szczepy *E.coli*

Norma liczebności śluzowych, laktozo – ujemnych bakterii z gatunku *Escherichia coli* w kale to $< 10^4$ CFU.



Rycina 24. Wykres ramka – wąsy liczebności śluzowych, laktozo-ujemnych szczepów *Escherichia coli* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 35. Liczebność drobnoustrojów z rodzaju *E.coli* w kale dzieci z grupy badanej

Jednostka chorobowa	<i>E.coli</i> szczepy śluzowe, laktozoujemne					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	4 210 00	14 931 855	20 000	70 000 000 100 000	20 000
CU	35	12 671 429	28 769 485	20 000	500 000 000	20 000
CD	43	35 186 977	103 376 435	20 000	000	20 000
Ogółem (NZJ)	100	20 491 600	70 990 305	20 000	500 000 000	20 000

CU – 2×10^4 CFU

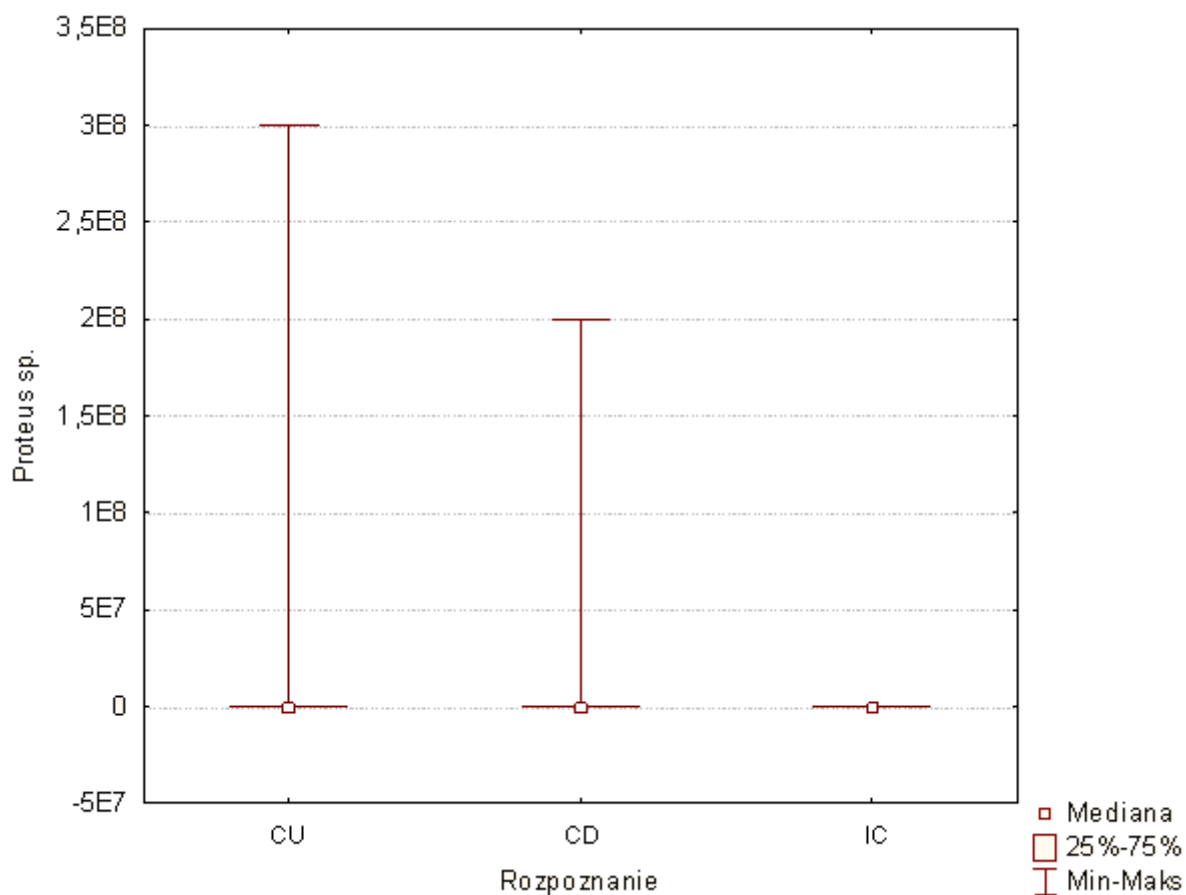
CD – 2×10^4 CFU

IC – 2×10^4 CFU

Liczebność śluzowych, laktozo – ujemnych szczepów *E.coli* była nieznacznie podwyższona we wszystkich analizowanych podgrupach pacjentów.

Proteus spp.

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Proteus* w kale to $< 10^4$ CFU.



Rycina 25. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Proteus* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 36. Liczebność drobnoustrojów z rodzaju *Proteus* w kale dzieci z grupy badanej

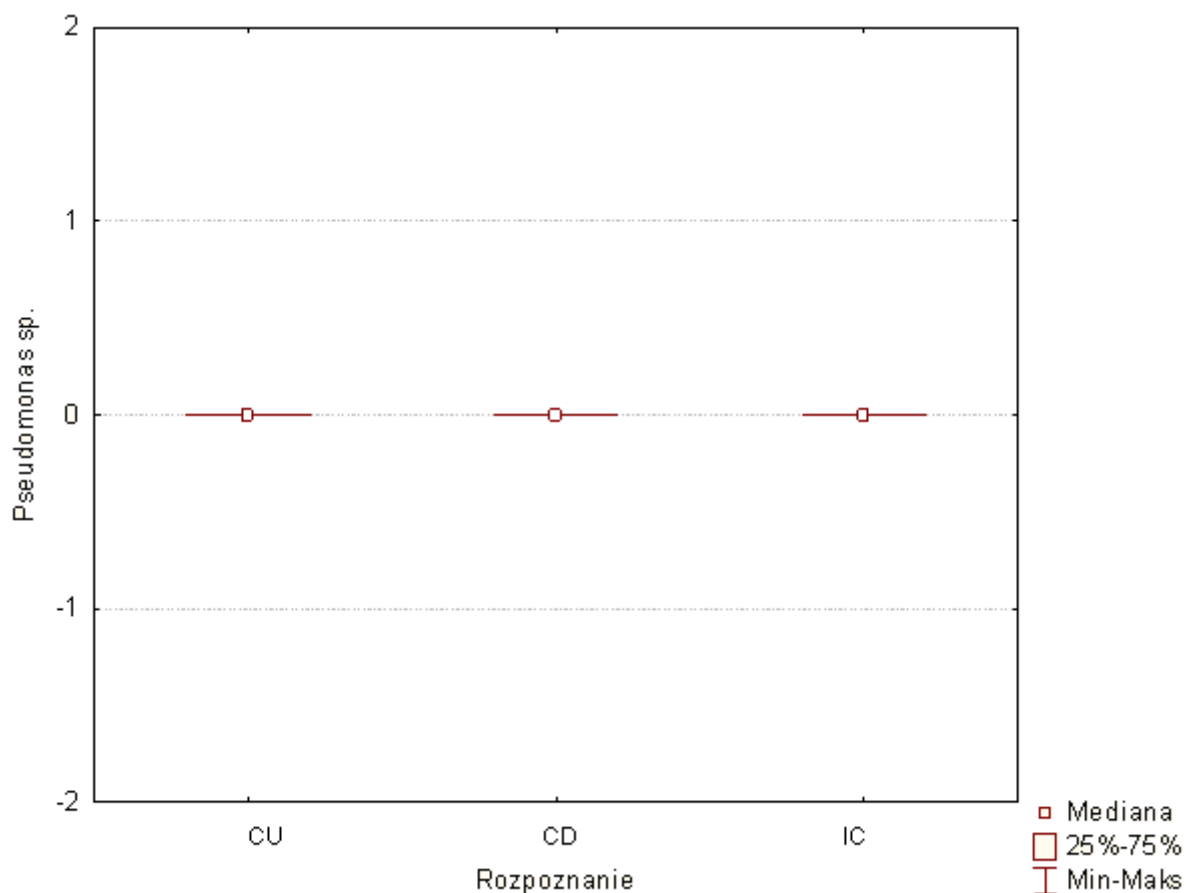
Jednostka chorobowa	<i>Proteus spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	20 000 23 102	0 68 890	20 000	20 000 300 000	20 000
CU	35	857 9 089	160 35 100	20 000	000 200 000	20 000
CD	43	767	942	20 000	000	20 000
Ogółem (NZJ)	100	11 999 000	47 241 315	20 000	300 000 000	20 000

CU – 2×10^4 CFU IC– 2×10^4 CFU CD – 2×10^4 CFU

Liczebność proteolitycznych bakterii z rodzaju *Proteus* była nieznacznie podwyższona we wszystkich analizowanych podgrupach pacjentów.

Pseudomonas spp.

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w kale to $< 10^4$ CFU.



Rycina 26. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas spp.* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 37. Liczebność drobnoustrojów z rodzaju *Pseudomonas* w kale dzieci z grupy badanej

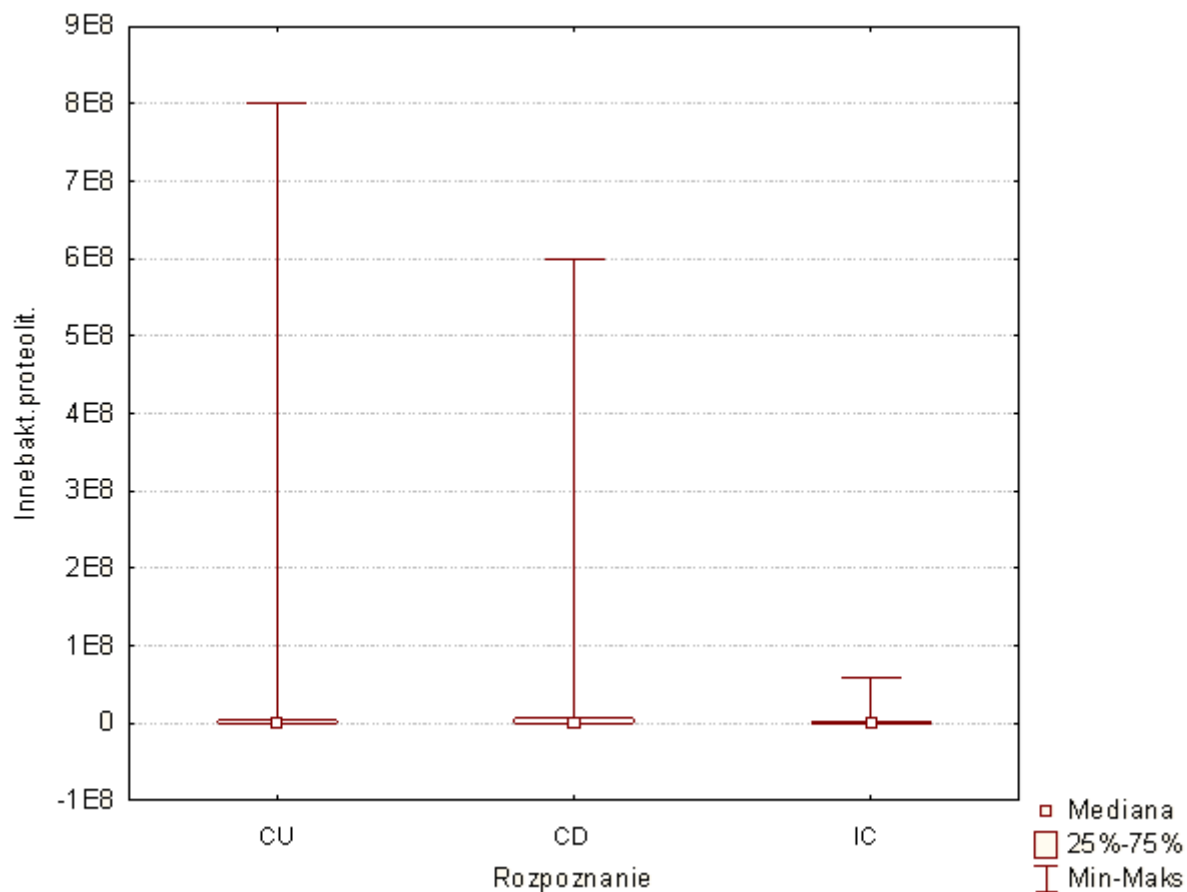
Jednostka chorobowa	<i>Pseudomonas spp</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	20 000	0	20 000	20 000	20 000
CU	35	20 000	0	20 000	20 000	20 000
CD	43	20 000	0	20 000	20 000	20 000
Ogółem (NZJ)	100	20 000	0	20 000	20 000	20 000

CU – 2×10^4 CFU CD – 2×10^4 CFU IC – 2×10^4 CFU

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych liczebność opisywanych bakterii była nieznacznie podwyższona.

Inne bakterie proteolityczne

Norma liczebności innych bakterii proteolitycznych w kale to $< 10^4$ CFU.



Rycina 27. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii proteolitycznych w kale pacjentów z NZJ

Tabela 38. Liczebność innych bakterii proteolitycznych w kale dzieci z grupy badanej

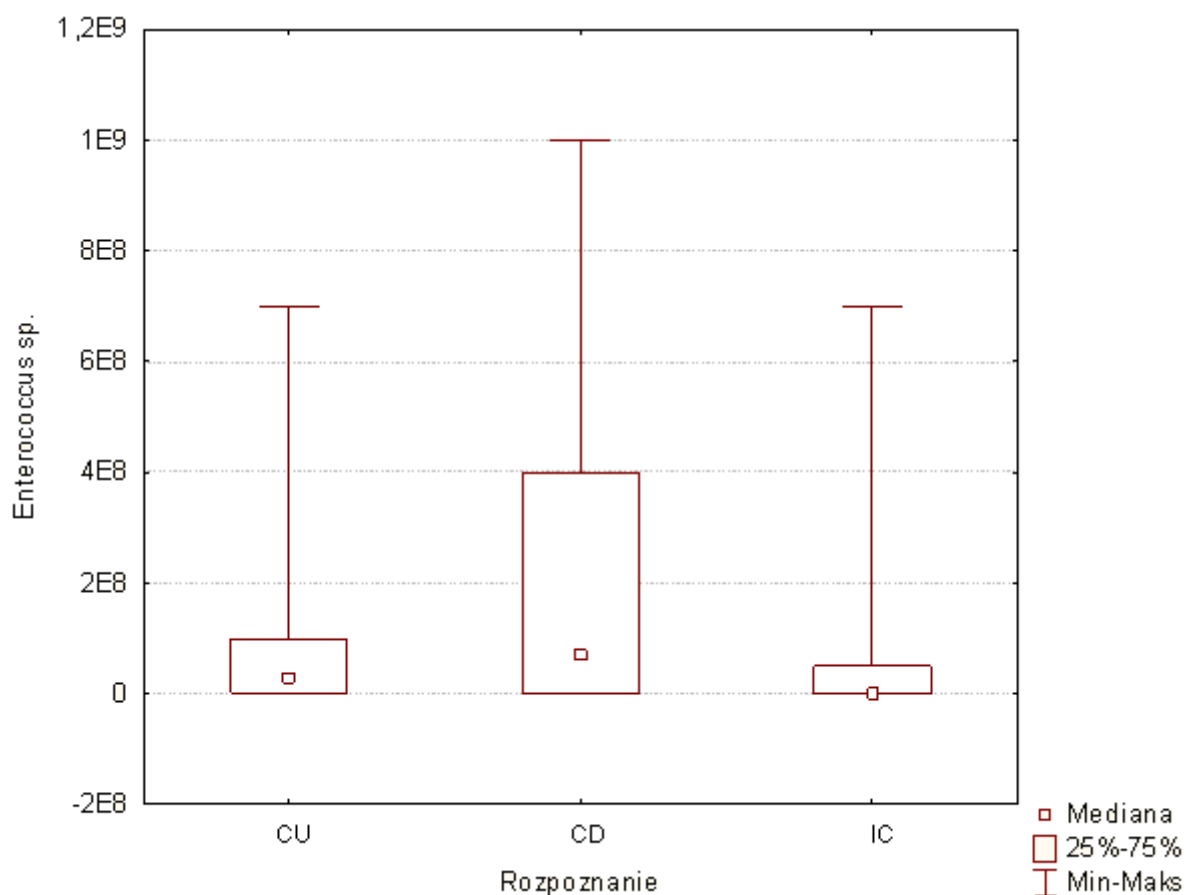
Jednostka chorobowa	Inne bakterie proteolityczne					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	7 149 091	16 887 015	20 000	60 000 000 800 000	20 000
CU	35	31 986 857	135 959 602	20 000	000 600 000	20 000
CD	43	39 143 256	118 899 703	20 000	000	20 000
Ogółem (NZJ)	100	29 599 800	112 071 560	20 000	800 000 000	20 000

CU – 2×10^4 CFU CD – 2×10^4 CFU IC – 2×10^4 CFU

We wszystkich analizowanych podgrupach pacjentów liczebność bakterii proteolitycznych była nieznacznie podwyższona.

Enterococcus spp.

Norma liczebności innych bakterii z rodzaju *Enterococcus* w kale to $\geq 10^6$ CFU.



Rycina 28. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. w kale pacjentów z NZJ

Tabela 39. Liczebność bakterii z rodzaju *Enterococcus* w kale dzieci z grupy badanej

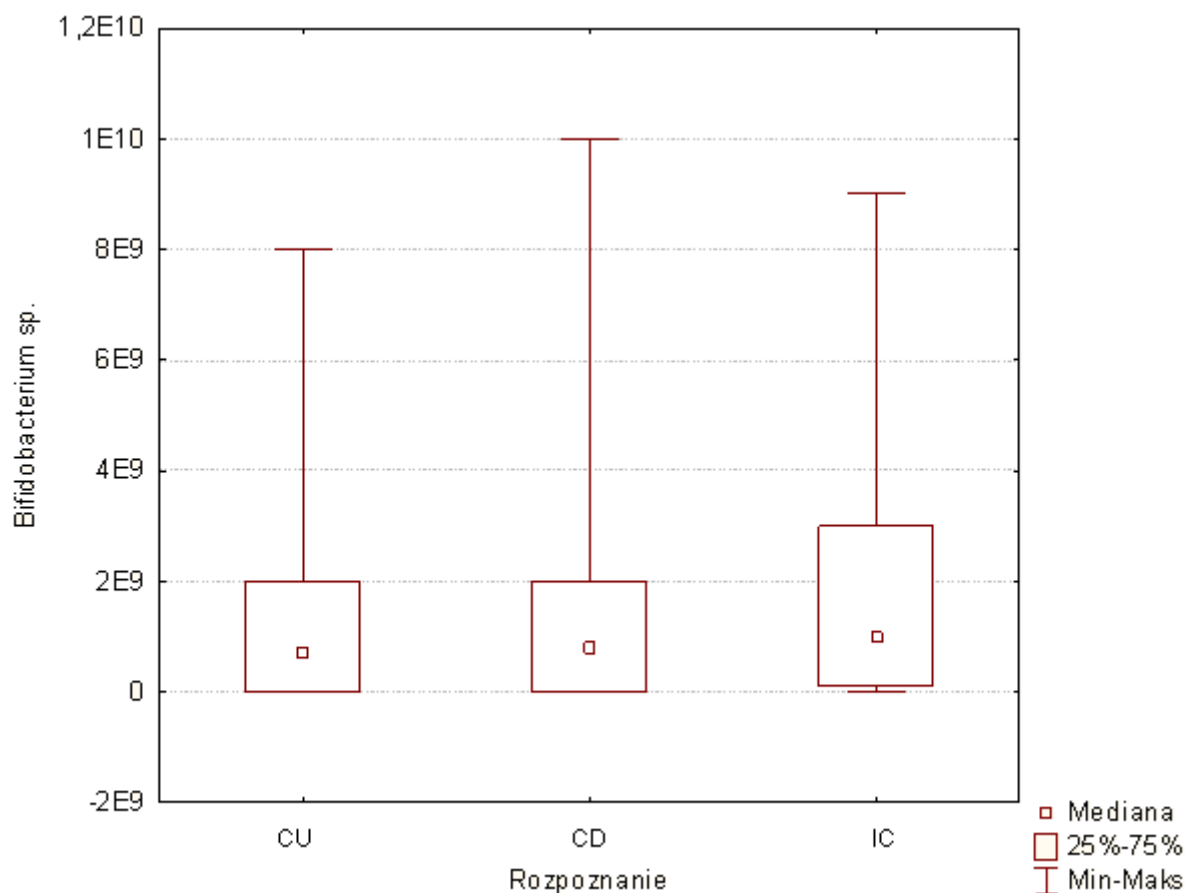
Jednostka chorobowa	<i>Enterococcus</i> spp.					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	87 080 909	189 818 119	20 000	700 000 000	2 000 000
CU	35	110 645 714	174 973 737	20 000	700 000 000	30 000 000
CD	43	193 573 953	252 627 090	20 000	1 000 000 000	70 000 000
Ogółem (NZJ)	100	141 120 600	217 727 131	20 000	1 000 000 000	30 000 000

CU – 3×10^7 CFU CD – 7×10^7 CFU IC – 2×10^6 CFU

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych liczebność opisywanych bakterii mieściła się w zakresie normy.

Bifidobacterium spp

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w kale to 10^9 - 10^{11} CFU.



Rycina 29. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 40. Liczebność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w kale dzieci z grupy badanej

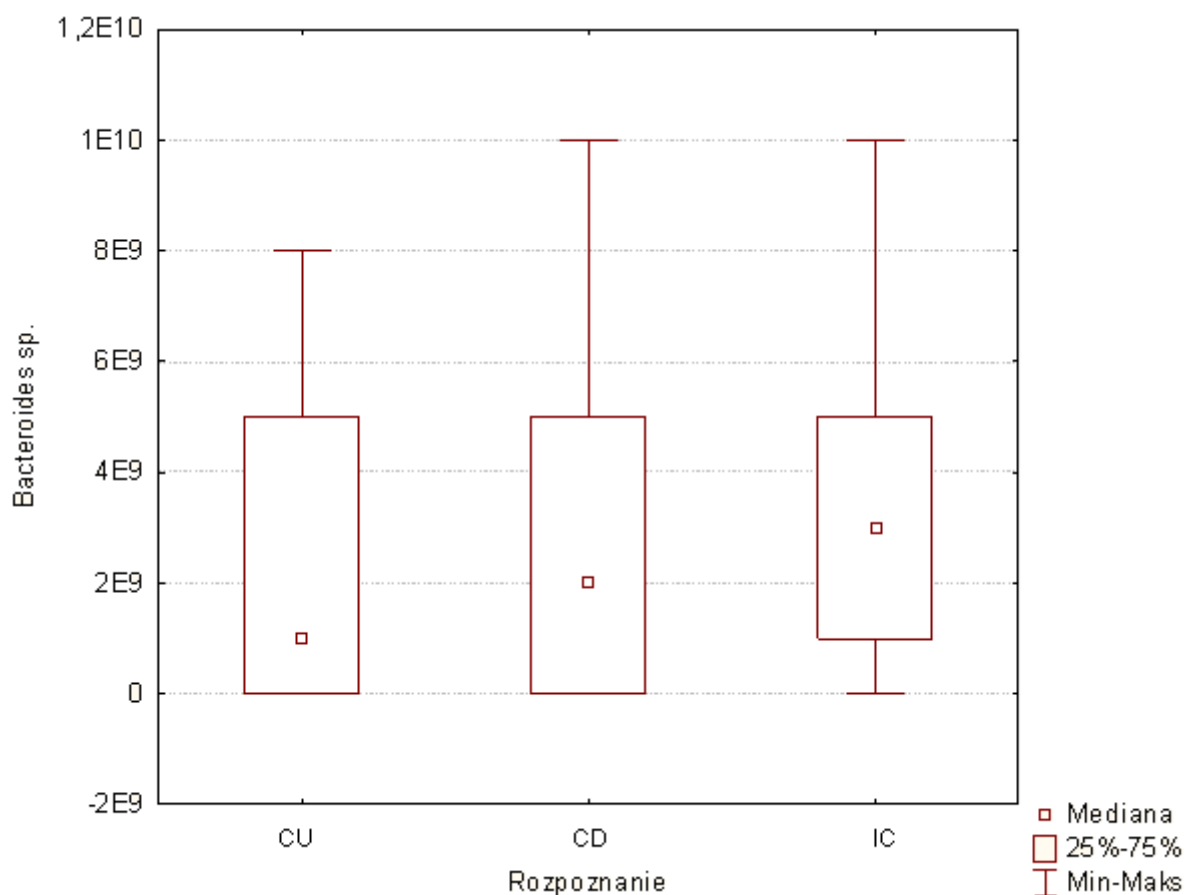
Jednostka chorobowa	<i>Bifidobacterium spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	1 768 181 818	2 151 585 542	40 000 000	9 000 000 000	1 000 000 000
CU	35	1 470 857 143	2 086 366 630	40 000 000	8 000 000 000	700 000 000
CD	43	1 742 790 698	2 608 037 326	40 000 000	10 000 000 000	800 000 000
Ogółem (NZJ)	100	1 653 200 000	2 319 641 595	40 000 000	10 000 000 000	800 000 000

CU – 7×10^8 CFU CD – 8×10^8 CFU IC – 1×10^9 CFU

U dzieci z colitis ideterminanta liczebność opisywanych bakterii mieściła się w zakresie normy, natomiast u pacjentów z colitis ulcerosa oraz chorobą Leśniowskiego – Crohna była obniżona w stosunku do normy.

Bacteroides spp.

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Bacteroides* w kale to 10^9 - 10^{11} CFU.



Rycina 30. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Bacteroides spp.* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 41. Liczebność bakterii z rodzaju *Bacteroides* w kale dzieci z grupy badanej

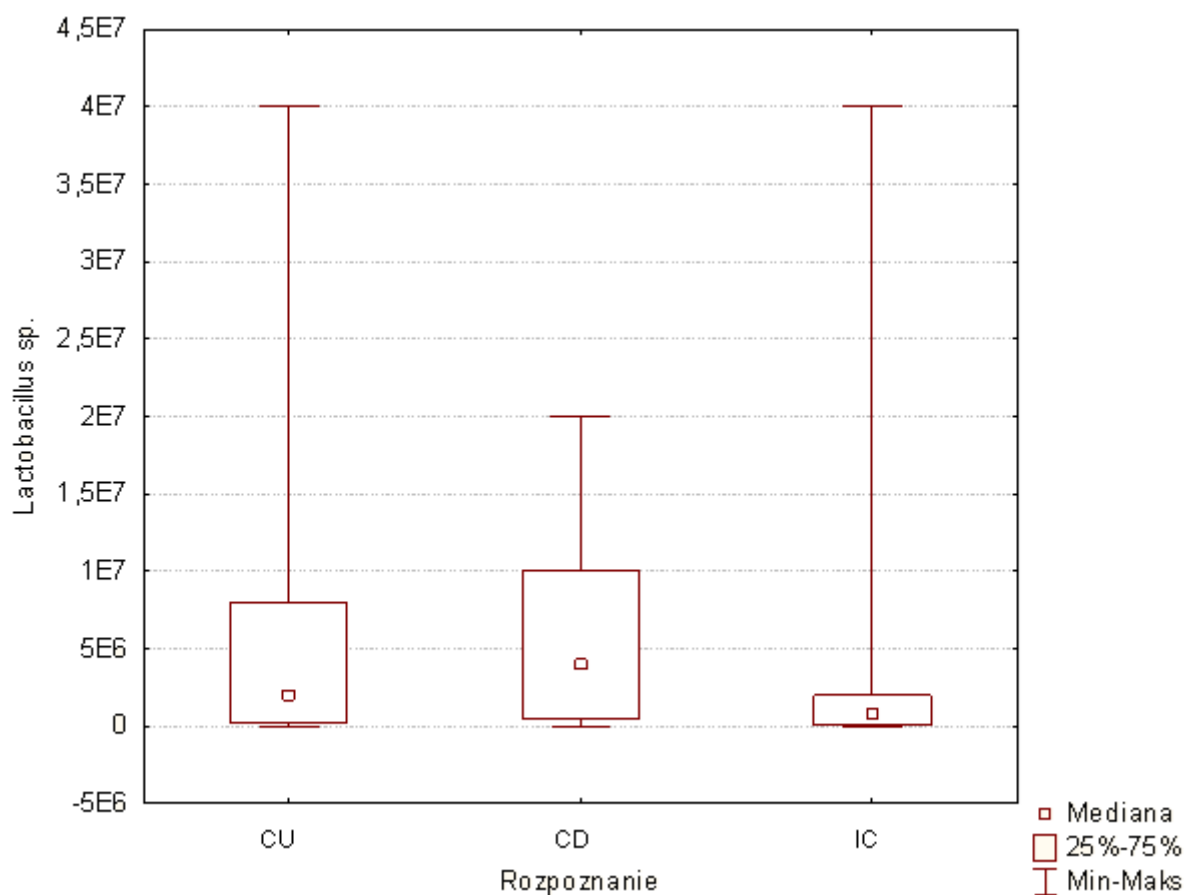
Jednostka chorobowa	<i>Bacteroides spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	3 150 909 091	2 782 802 474	40 000 000	10 000 000 000	3 000 000 000
CU	35	2 522 857 143	2 581 937 908	40 000 000	8 000 000 000	1 000 000 000
CD	43	2 691 627 907	2 755 421 435	40 000 000	10 000 000 000	2 000 000 000
Ogółem (NZJ)	100	2 733 600 000	2 684 827 373	40 000 000	10 000 000 000	2 000 000 000

CU – 1×10^9 CFU CD – 2×10^9 CFU IC – 3×10^9 CFU

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych liczebność opisywanych bakterii mieściła się w dolnym zakresie normy.

Lactobacillus spp.

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w kale to $\geq 10^5$ CFU.



Rycina 31. Wykres ramka – wasy liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 42. Liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w kale dzieci z grupy badanej

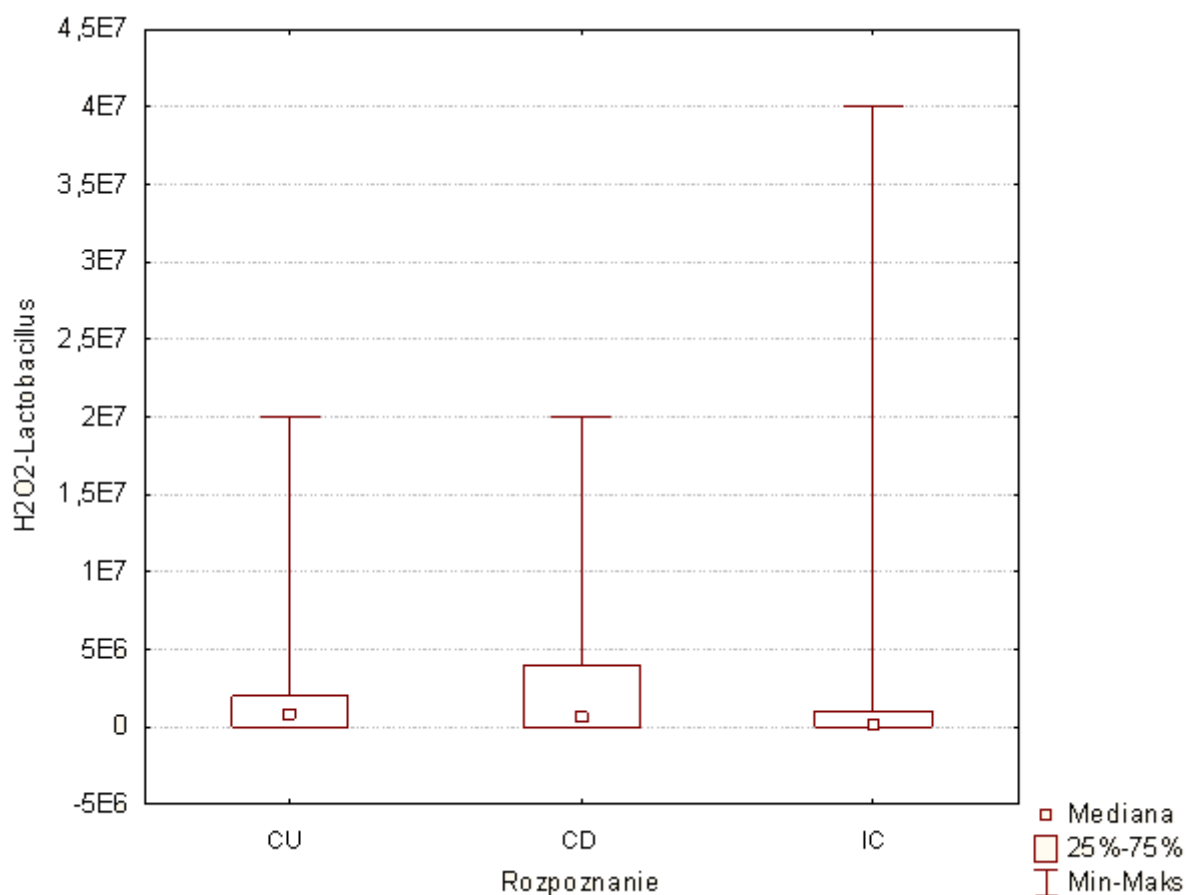
Jednostka chorobowa	<i>Lactobacillus spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	5 307 273	10 783 643	20 000	40 000 000	850 000
CU	35	5 836 571	8 675 637	20 000	40 000 000	2 000 000
CD	43	5 472 558	5 966 578	20 000	20 000 000	4 000 000
Ogółem (NZJ)	100	5 563 600	8 103 313	20 000	40 000 000	2 000 000

CU – 2×10^6 CFU CD – 4×10^6 CFU IC – 9×10^5 CFU

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych liczebność opisywanych bakterii mieściła się w zakresie normy.

H₂O₂ *Lactobacillus*

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w kale to $\geq 10^5$ CFU.



Rycina 32. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *H₂O₂ Lactobacillus spp.* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 43. Liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* produkujących nadtlenuk wodoru w kale dzieci z grupy badanej

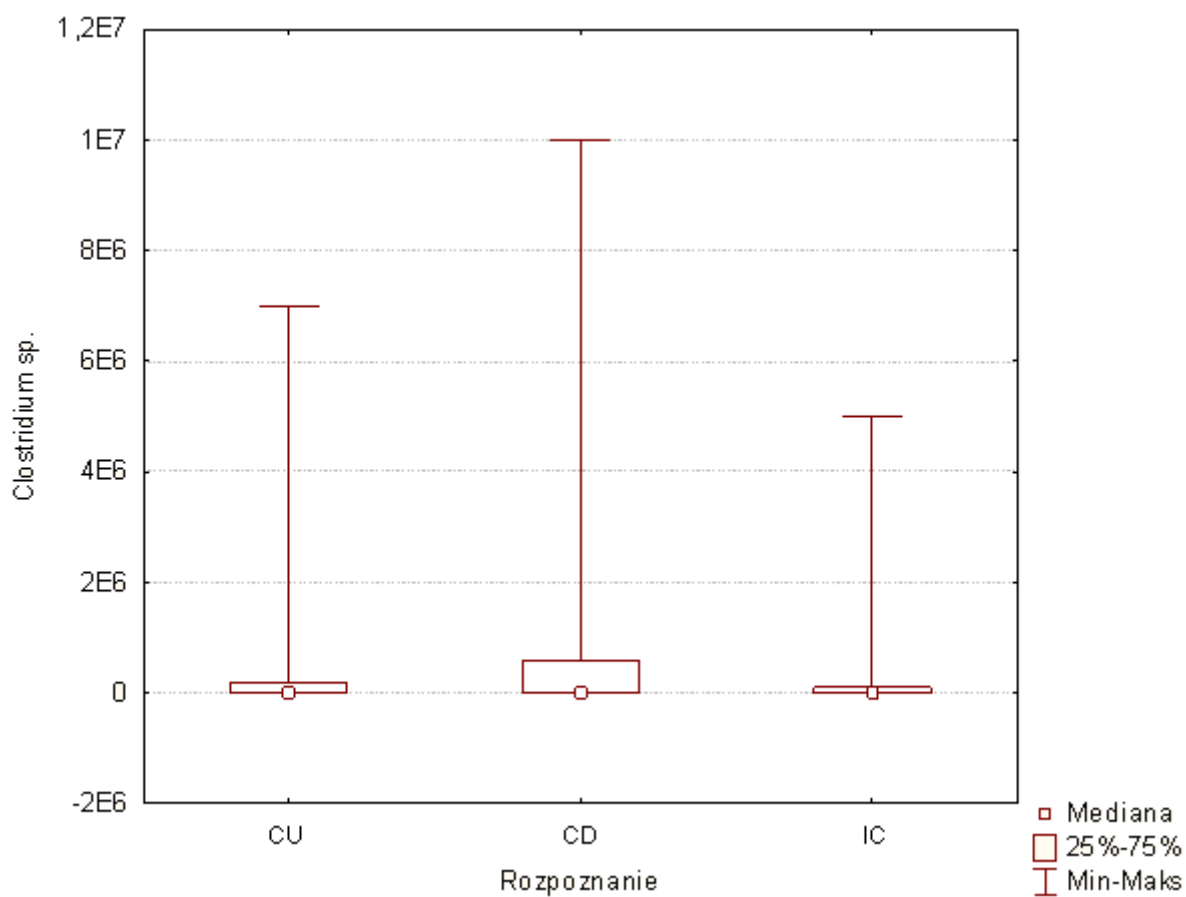
Jednostka chorobowa	<i>H2O2-Lactobacillus spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	3 377 636	9 310 131	8 000	40 000 000	100 000
CU	35	3 152 000	5 757 107	20 000	20 000 000	800 000
CD	43	2 893 023	4 836 959	20 000	20 000 000	600 000
Ogółem (NZJ)	100	3 090 280	6 303 292	8 000	40 000 000	600 000

CU – 8×10^5 CFU CD – 6×10^5 CFU IC – 1×10^5 CFU

We wszystkich analizowanych jednostkach chorobowych liczebność opisywanych bakterii mieściła się w zakresie normy.

Clostridium spp.

Norma liczebności bakterii z rodzaju *Clostridium spp.* w kale to $\leq 10^5$ CFU.



Rycina 33. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Clostridium* w kale pacjentów z NZJ

Tabela 44. Liczebność bakterii z rodzaju *Clostridium* w kale dzieci z grupy badanej

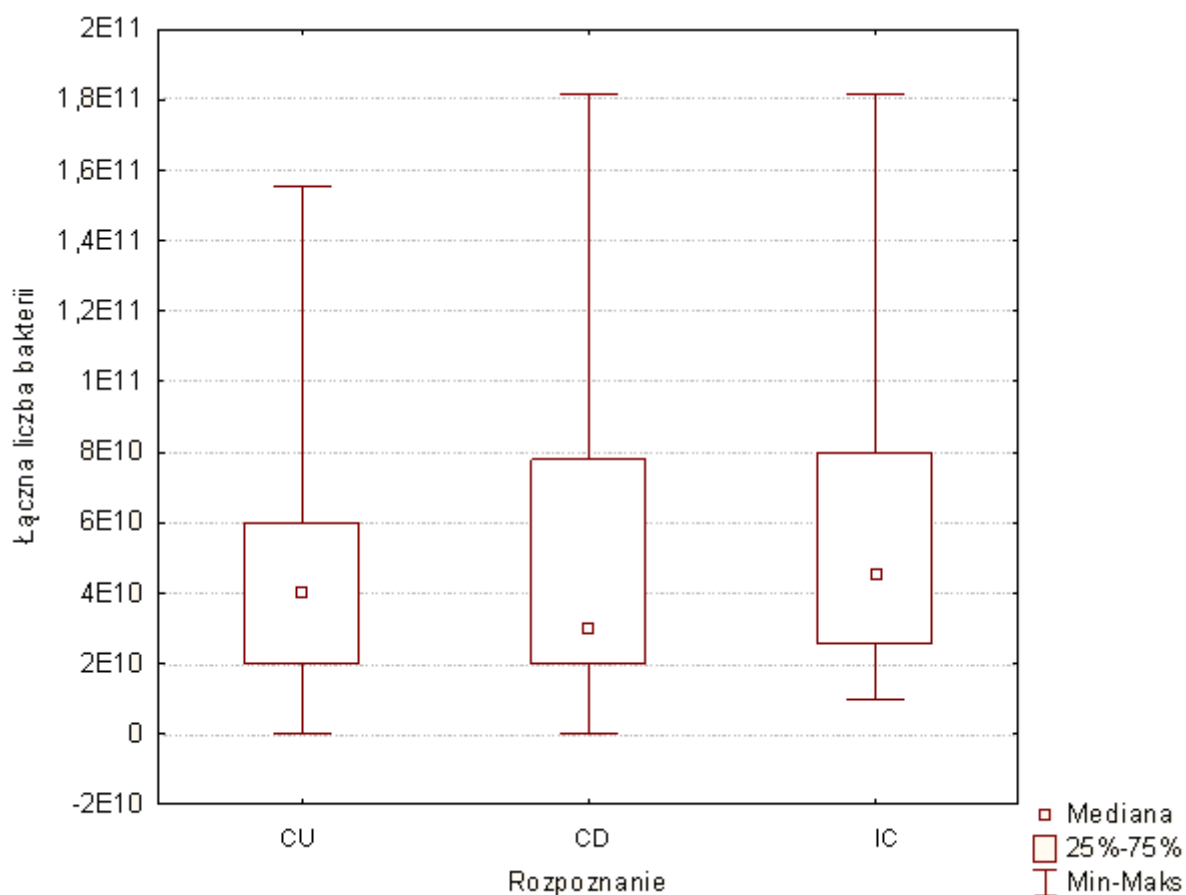
Jednostka chorobowa	<i>Clostridium spp.</i>					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	471 818	1 204 257	20 000	5 000 000	20 000
CU	35	491 429	1 362 405	20 000	7 000 000	20 000
CD	43	1 065 581	2 406 192	20 000	10 000 000	20 000
Ogółem (NZJ)	100	734 000	1 866 865	20 000	10 000 000	20 000

CU – 2×10^4 CFU CD – 2×10^4 CFU IC – 2×10^4 CFU

Liczebność *Clostridium spp.* mieści się w granicach normy u wszystkich podgrup dzieci w grupie badanej.

Łączna liczba bakterii

Norma łącznej liczby bakterii w kale to 10^{11} - 10^{12} CFU.



Rycina 34. Wykres ramka – wąsy ogólnej liczebności bakterii w kale pacjentów z NZJ

Tabela 45. Łączna liczba bakterii w kale dzieci z grupy badanej

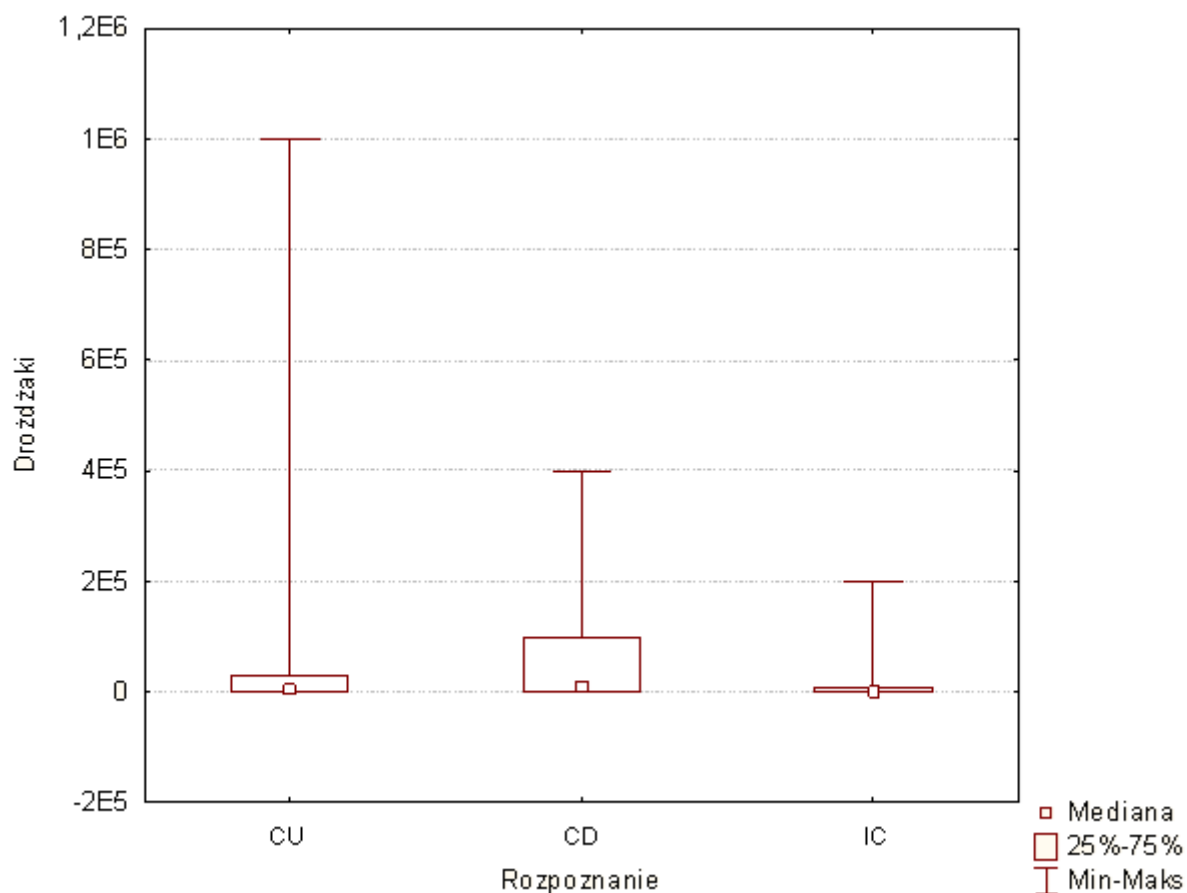
Jednostka chorobowa	Łączna liczba bakterii					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	59 895 201 056	45 845 469 988	10 000 000 000	181 561 972 207	45 000 000 000
CU	35	44 017 517 066	31 332 542 528	6 973 568 802	155 624 547 606	40 000 000 000
CD	43	50 708 652 425	40 988 692 595	6 973 568 802	181 561 972 207	30 000 000 000
Ogółem (NZJ)	100	50 387 795 748	39 118 198 363	6 973 568 802	181 561 972 207	40 000 000 000

CU – 5×10^{10} CFU CD – 3×10^{10} CFU IC – 5×10^{10} CFU

Ogólna liczba bakterii jest obniżona we wszystkich omawianych podgrupach pacjentów.

Candida spp.

Norma liczebności grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* to $<10^3$ CFU.



Rycina 35. Wykres ramka – wąsy ogólnej liczebności drożdżaków w kale pacjentów z NZJ

Tabela 46. Liczebność drożdżaków w kale dzieci z grupy badanej

Jednostka chorobowa	Drożdżaki					
	N	Średnia	Odch.std	Minimum	Maksimum	Mediana
IC	22	22 091	57 945	1 000	200 000	1 500
CU	34	80 294	200 758	1 000	1 000 000	6 500
CD	43	72 023	107 087	1 000	400 000	10 000
Ogółem (NZJ)	99	63 768	140 430	1 000	1 000 000	5 000

CU – 7×10^3 CFU CD – 1×10^4 CFU IC – 2×10^3 CFU

Ogólna liczba drożdżaków była podwyższona we wszystkich analizowanych podgrupach pacjentów, najsilniej w przypadku dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna.

- **Liczebność poszczególnych drobnoustrojów w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby**

W kolejnym etapie pracy podjęto próbę ustalenia ewentualnych zależności pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością analizowanych drobnoustrojów. Celem było ustalenie czy zaostrzenie/ złagodzenie stanu zapalnego jest powiązane ze zmianą liczby poszczególnych bakterii w kale. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę dla wszystkich dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit, w następnej w podziale na poszczególne jednostki chorobowe.

Nieswoiste choroby zapalne jelit

Stopień aktywności klinicznej choroby koreluje ujemnie z:

- ***Bifidobacterium spp.***

Występuje istotna statystycznie ujemna korelacja pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością bakterii rodzaju *Bifidobacterium spp.* ($p=0,01$), jednak jest to słaba zależność ($R=-0,28$).

- ***Bacteroides spp.***

Występuje istotna statystycznie ujemna korelacja pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością bakterii rodzaju *Bacteroides* ($p= 0,006$) jednak jest to słaba zależność ($R=-0,31$).

- **łącznie liczbą bakterii**

Występuje istotna statystycznie ujemna korelacja pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a ogólną liczbą bakterii ($p=0,002$) jednak jest to słaba zależność ($R=-0,35$).

Stopień aktywności klinicznej choroby koreluje dodatnio z:

- **liczebnością drożdżaków ($p=0,01$)**

Występuje istotna statystycznie dodatnia korelacja pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a ogólną liczbą bakterii ($p=0,01$) jednak jest to słaba zależność ($R=0,28$).

Wrzodziejace zapalenie jelita grubego

Porównywano liczebność analizowanych grup drobnoustrojów u pacjentów w stadium łagodnym, umiarkowanym i ciężkim.

Tabela 47. Wartości testu F i poziomu istotności p w analizie wpływu stopnia aktywności choroby na liczebność drobnoustrojów we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

MIKROORGANIZM	CU	
	F	p
<i>E.coli</i>	1,72	0,19
<i>E.coli Biovare</i>	1,45	0,25
<i>Proteus spp.</i>	0,31	0,74
<i>Inne bakt.proteolit.</i>	0,31	0,74
<i>Enterococcus spp.</i>	0,10	0,90
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,25	0,30
<i>Bacteroides spp.</i>	1,25	0,30
<i>Lactobacillus spp.</i>	1,36	0,27
<i>H2O2-Lactobacillus</i>	1,29	0,29
<i>Clostridium spp.</i>	0,87	0,43
<i>Łączna liczba bakterii</i>	1,27	0,29
<i>Drożdżaki</i>	0,67	0,52

W świetle uzyskanych wartości testowych należy uznać, że stopień aktywności klinicznej choroby nie ma wpływu na liczebność żadnej z analizowanych grup drobnoustrojów.

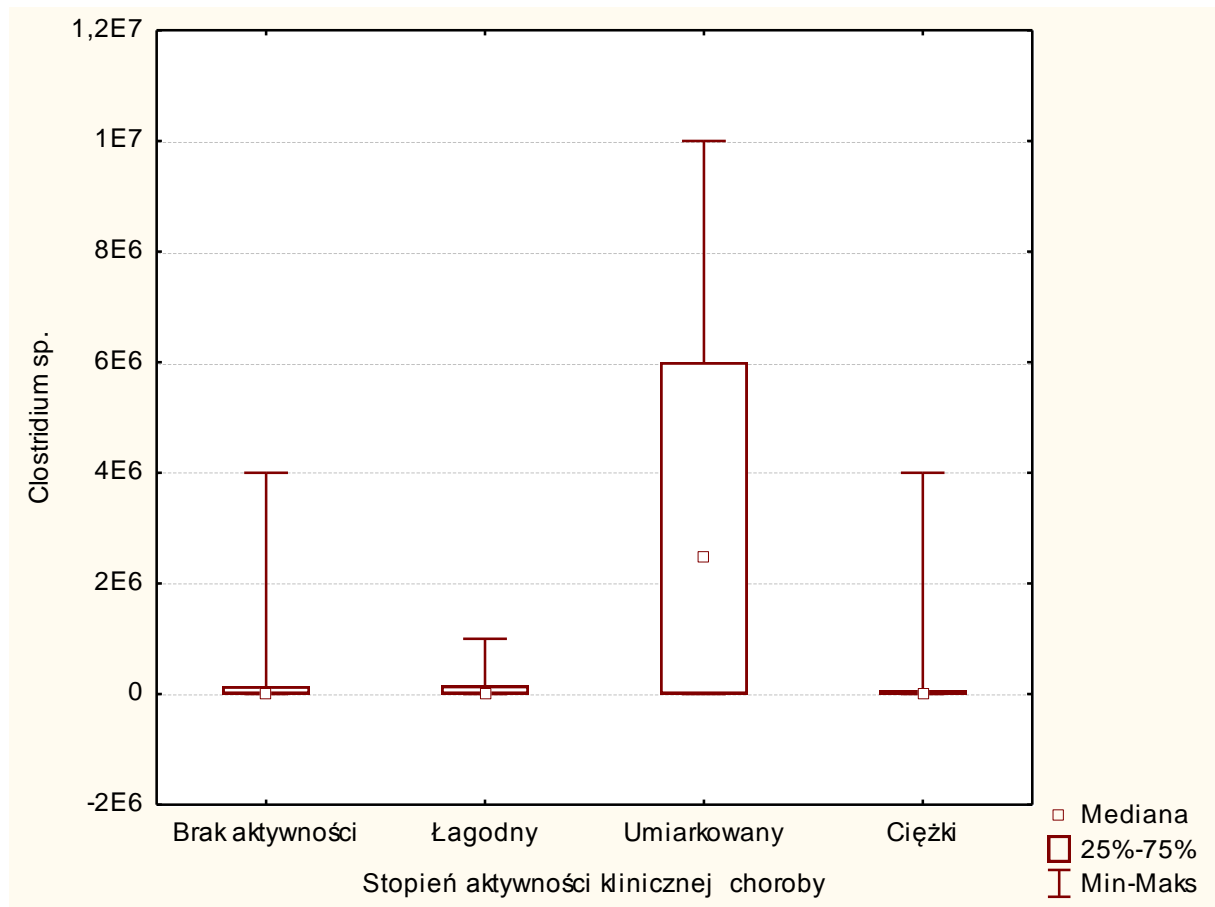
Tabela 48. Wartości testu F i poziomu istotności p w analizie wpływu stopnia aktywności choroby na liczebność drobnoustrojów w chorobie Leśniowskiego – Crohna (różnice są istotne dla $p \leq 0,05$).

MIKROORGANIZM	CD	
	F	p
<i>E.coli</i>	2,16	0,11
<i>E.coli Biovare</i>	0,75	0,53
<i>Proteus spp.</i>	1,36	0,27
<i>Inne bakt.proteolit.</i>	0,23	0,87
<i>Enterococcus spp.</i>	1,49	0,23
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,82	0,16
<i>Bacteroides spp.</i>	2,19	0,10
<i>Lactobacillus spp.</i>	0,61	0,61
<i>H2O2-Lactobacillus</i>	1,08	0,37
<i>Clostridium spp.</i>	5,47	0,00
<i>Łączna liczba bakterii</i>	3,00	0,04
<i>Drożdżaki</i>	3,72	0,02

F – test ilorazu wariancji p- prawdopodobieństwo CD - choroba Leśniowskiego – Crohna

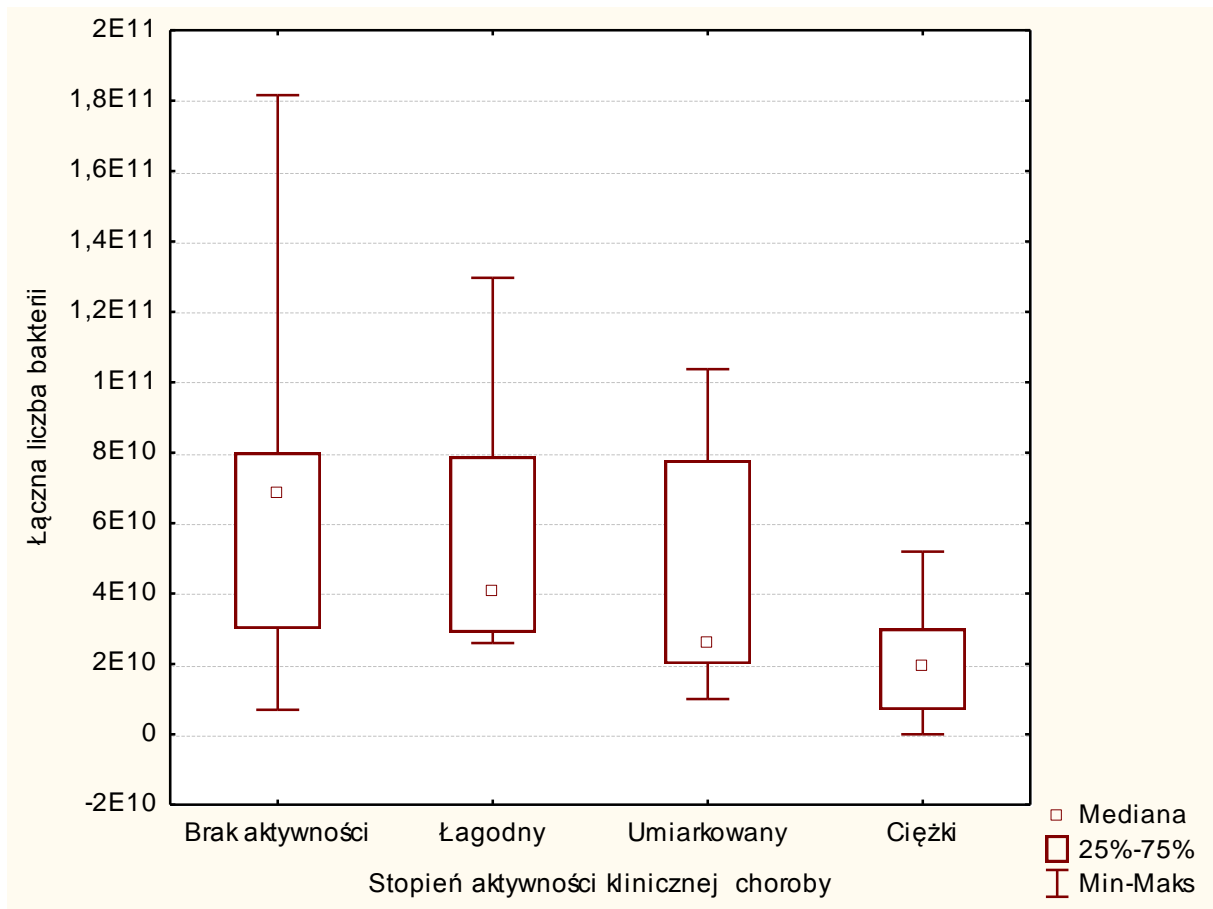
Wykazano istotne statystycznie różnice dla poszczególnych stadiów aktywności choroby w odniesieniu do liczebności:

- bakterii z rodzaju *Clostridium*



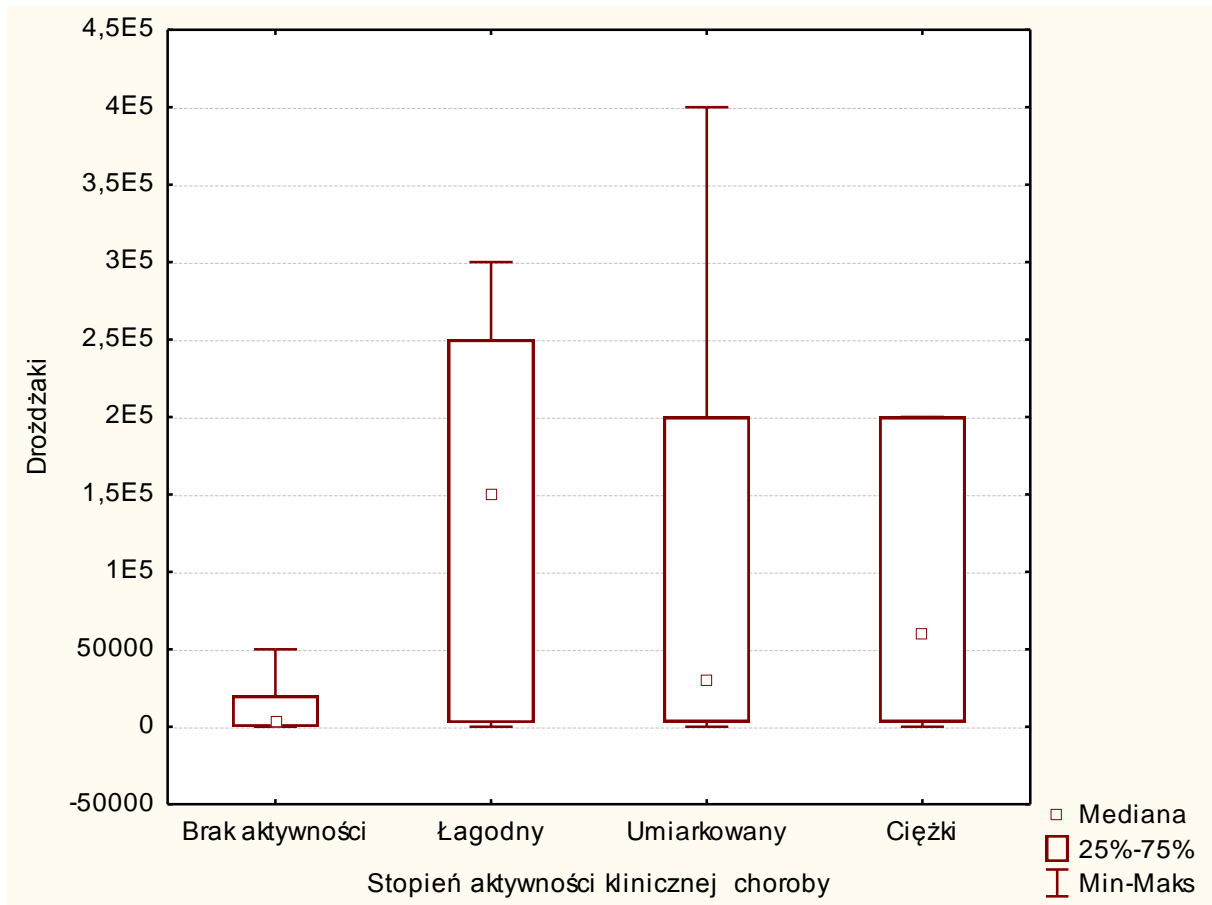
Rycina 36. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii z rodzaju *Clostridium* w kale w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna

- ogólnej liczby bakterii



Rycina 37. Wykres ramka – wąsy ogólnej liczby bakterii w kale w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna

- **grzybów drożdżopodobnych**



Rycina 38. Wykres ramka – wąsy liczebności drożdżaków w kale w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna

- **Liczebność mikroflory ochronnej, stymulującej oraz proteolitycznej a stopień aktywności klinicznej choroby**

Oceniono następnie korelację pomiędzy zaostrzeniem stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym a liczebnością drobnoustrojów przydzielonych do określonych grup.

Tabela 49. Wartości testu F i poziomu istotności p w analizie wpływu stopnia aktywności choroby na liczebność grup drobnoustrojów w NZJ (różnice są istotne dla $p \leq 0,05$).

GRUPY MIKROORGANIZMÓW	CU		CD	
	F	p	F	p
Bakterie stymulujące	1,14	0,33	1,94	0,17
Bakterie ochronne	1,50	0,24	0,55	0,58
Bakterie proteolityczne	0,07	0,94	0,60	0,56

F – test ilorazu wariancji

p- prawdopodobieństwo

Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych grup bakterii w zależności od stadium aktywności klinicznej choroby.

Postanowiono ocenić także występowanie ewentualnych korelacji pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby, a liczebnością wyodrębnionych grup bakterii (współczynnik korelacji jest istotny z $p < 0,05$).

- Colitis ulcerosa

Tabela 50. Wartości korelacji pomiędzy liczebnością wyodrębnionych grup bakterii a aktywnością kliniczną wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

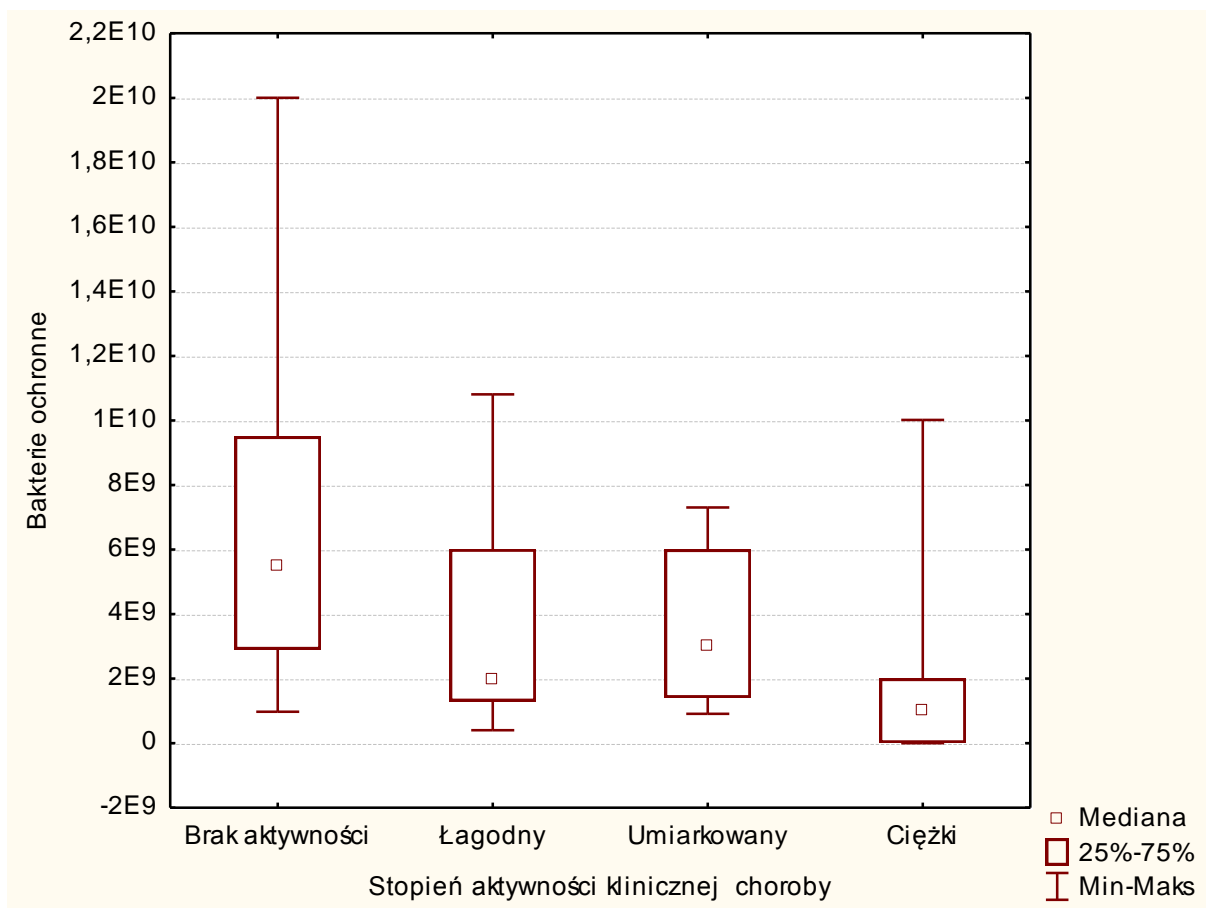
KORELACJA	N	R	t(N-2)	p
Bakterie stymulujące & Stopień aktywności klinicznej choroby	35	0,181	1,055	0,2990
Bakterie ochronne & Stopień aktywności klinicznej choroby	35	-0,297	-1,789	0,0828
Bakterie proteolityczne & Stopień aktywności klinicznej choroby	35	-0,055	-0,316	0,7540

- Choroba Leśniowskiego – Crohna

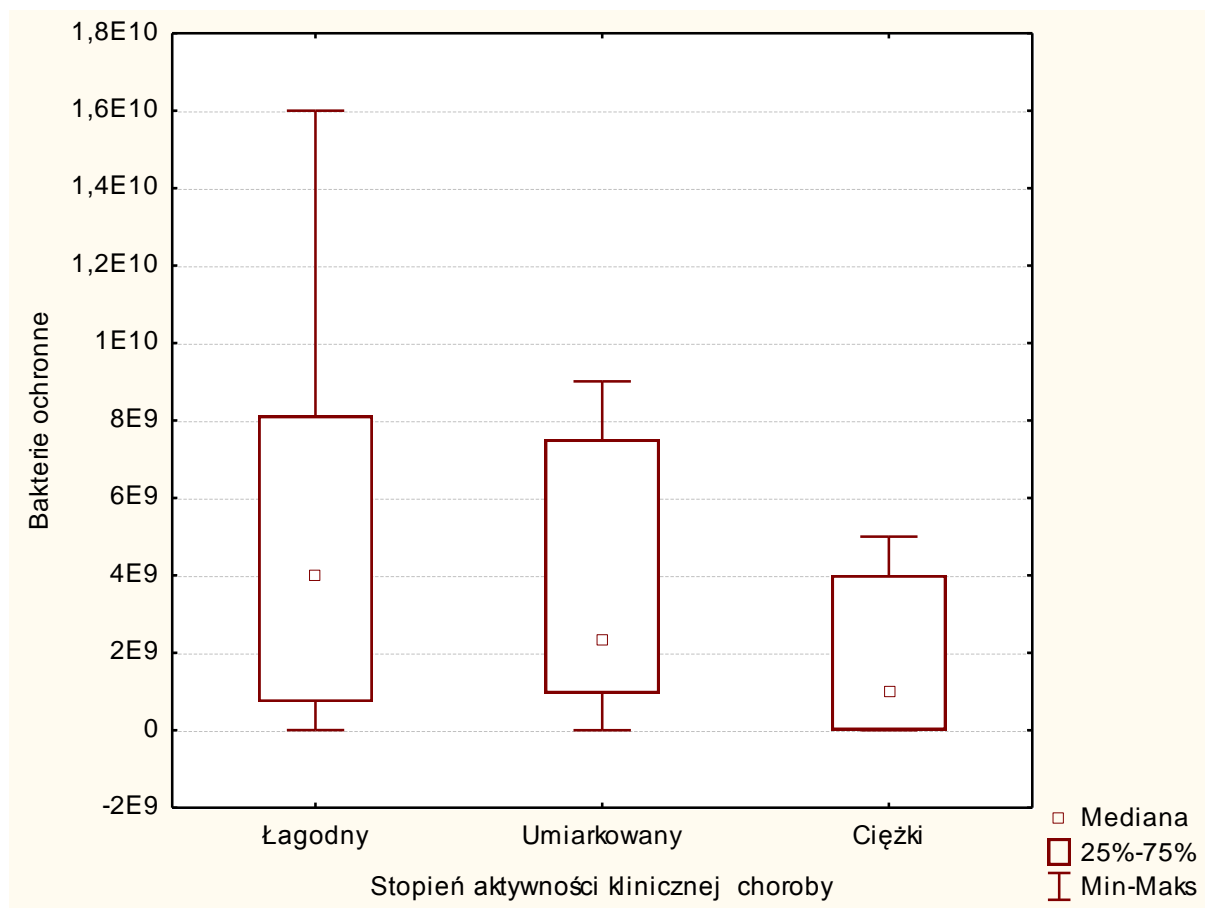
Tabela 51. Wartości korelacji pomiędzy liczebnością wyodrębnionych grup bakterii a aktywnością kliniczną Choroby Leśniowskiego – Crohna

KORELACJA	N	R	t(N-2)	p
Bakterie stymulujące & Stopień aktywności klinicznej choroby	43	0,060	0,386	0,7016
Bakterie ochronne & Stopień aktywności klinicznej choroby	43	-0,419	-2,955	0,0052
Bakterie proteolityczne & Stopień aktywności klinicznej choroby	43	0,219	1,439	0,1578

Wykazano wyraźną zależność pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością bakterii o właściwościach ochronnych ($R=-0,419$). Ujemny współczynnik korelacji wskazuje na odwrotnie proporcjonalny przebieg korelacji – im mniejsza liczebność mikroflory ochronnej tym większe zaostrenie zmian zapalnych. Również u pacjentów z colitis ulcerosa pojawia się podobna tendencja, jednak nie osiąga ona wartości istotnej statystycznie ($p=0,08$).



Rycina 39. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii ochronnych w kale w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna



Rycina 40. Wykres ramka – wąsy liczebności bakterii ochronnych w kale w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z colitis ulcerosa

Zaznaczyć należy, iż rozgraniczenie analizowanej grupy pacjentów na poszczególne jednostki chorobowe oraz ze względu na aktywność stanowiło ograniczenie przeprowadzonej korelacji. Liczba poszczególnych obserwacji w określonych stopniach aktywności klinicznej choroby była bowiem dosyć niska.

- **Liczebność poszczególnych drobnoustrojów w zależności od wieku pacjenta oraz czasu od postawienia diagnozy**

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy wiekiem badanych dzieci a liczebnością ocenianych mikroorganizmów. Podobnie czas od postawienia rozpoznania wydaje się nie mieć wpływu na liczbę analizowanych mikrobiota.

Analiza zależności pomiędzy parametrami stanu zapalnego oraz stopniem aktywności choroby a wybranymi mikroorganizmami

Kolejnym etapem pracy była ocena ewentualnych zależności pomiędzy stężeniem markerów stanu zapalnego w kale oraz osoczu a liczebnością oznaczanych drobnoustrojów.

- **Markery zapalne w kale i stopień aktywności klinicznej choroby a mikroorganizmy**

Poniżej przedstawiono istotne statystycznie korelacje pomiędzy aktywnością choroby i poziomem markerów zapalnych w kale a liczebnością wybranych drobnoustrojów:

Bifidobacterium spp.

Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy poziomem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* a aktywnością dimerowej formy kinazy pirogronianowej w kale M2-PK ($p = 0,05$). Im wyższa była aktywność M2-PK tym niższą obserwowano liczebność bifidobakterii.

Bacteroides spp.

Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy poziomem bakterii z rodzaju *Bacteroides* a poziomem wszystkich markerów oznaczanych w kale (M2-PK $p = 0,02$; kalprotektyna $p=0,03$; laktoferyna $p = 0,01$). Im wyższy był poziom markerów tym niższą obserwowano liczebność bakterii.

Drożdżaki

Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy poziomem grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* a aktywnością M2-PK i stężeniem laktoferyny w kale (M2-PK $p = 0,001$; laktoferyna $p = 0,003$). Im wyższa była aktywność M2-PK i stężenie laktoferyny tym wyższą obserwowano liczebność drożdżaków.

Łączna liczba bakterii

Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy łączną liczbą bakterii a aktywnością M2 – PK i stężeniem laktoferyny w kale (M2-PK $p = 0,02$; laktoferyna $p=0,007$). Im wyższy był poziom markerów tym niższą obserwowano liczbę bakterii.

Podobną analizę przeprowadzono dla wyodrębnionych grup bakterii:

Bakterie pełniące funkcje ochronne

Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy poziomem bakterii ochronnych a aktywnością M2-PK i stężeniem laktoferyny w kale (M2-PK $p = 0,005$; laktoferyna $p = 0,005$). Im wyższy był poziom markerów tym niższą obserwowano liczebność grupy.

Bakterie proteolityczne

Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy poziomem bakterii proteolitycznych a aktywnością M2-PK i stężeniem laktoferyny w kale (M2-PK $p = 0,009$; laktoferyna $p = 0,02$). Im wyższy był poziom markerów tym wyższą obserwowano liczebność owych bakterii.

3.1. Podsumowanie wyników w zakresie badań mikrobiologicznych i grzybów

- W kale dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit zaobserwowano zwiększoną liczebność potencjalnie patogennych szczepów *Escherichia coli* (laktozo - ujemnych, śluzowych), bakterii z rodzaju *Proteus*, *Pseudomonas*, bakterii proteolitycznych oraz grzybów drożdżopodobnych.
- W kale dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit zaobserwowano zmniejszoną łączną liczbę bakterii.
- U dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna liczebność drożdżaków przekraczała normę w większym stopniu aniżeli w pozostałych podgrupach pacjentów.
- U dzieci z colitis indeterminanta liczebność *Bifidobacterium spp.* mieściła się w zakresie normy fizjologicznej, natomiast u pacjentów z colitis ulcerosa oraz chorobą Leśniowskiego – Crohna była obniżona w stosunku do normy.
- U dzieci z colitis ulcerosa nie wykazano korelacji pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością żadnej z analizowanych grup drobnoustrojów.
- U dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna stopień aktywności choroby istotnie koreluje z łączną liczbą bakterii, liczebnością grzybów drożdżopodobnych oraz bakterii z rodzaju *Clostridium*.
- Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych grup bakterii kałowych (ochronnych, proteolitycznych i immunostymulujących) w

zależności od stadium aktywności klinicznej choroby u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit.

- Wykazano wyraźną, ujemną korelację pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego – Crohna, a liczebnością bakterii o właściwościach ochronnych. Im mniejsza jest liczebność mikroflory ochronnej tym większe wydaje się być zaostrzenie zmian zapalnych. U pacjentów z colitis ulcerosa obserwuje się podobną tendencję zmian.
- Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy wiekiem badanych dzieci oraz czasem od postawienia diagnozy a liczebnością ocenianych mikroorganizmów.
- Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy:
 - poziomem wszystkich analizowanych markerów kałowych a liczebnością *Bacteroides spp.*
 - liczebnością grupy bakterii ochronnych i *Bacteroides spp.* a aktywnością M2 – PK i stężeniem laktoferyny w kale
 - aktywnością M2-PK a liczebnością *Bifidobacterium spp.*
- Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy
 - poziomem grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* a aktywnością M2-PK i laktoferyny w kale
 - poziomem bakterii proteolitycznych a aktywnością M2-PK i stężeniem laktoferyny w kale

4. Badanie częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* u dzieci z NZJ

W niniejszej pracy określono częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla standardowego zestawu polimorfizmów genu *NOD2* związanych z występowaniem nieswoistych zapaleń jelit. Genotypy określone u każdego z badanych pacjentów (wg numeracji nadanej w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu) zestawiono w tabeli H (patrz aneks)

4.1. Badania molekularne

W analizie DNA określono występowanie polimorfizmów: c.3020insC, c.802C>T c.2104C>T, c.2722G>C w badanej grupie chorych. Określono również częstość ich występowania w grupie kontrolnej. Obrazy rozdziału elektroforetycznego analizowanych polimorfizmów załączono w aneksie (ryc. 41-44).

4.2. Występowanie wybranych polimorfizmów genu *NOD2*

Oznaczano częstości alleli poszczególnych wariantów polimorficznych genu *NOD2* w grupie pacjentów pediatrycznych z podziałem na typy chorób wchodzące w skład nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Insercja c.3020insC

Badanie częstości insercji c.3020insC przeprowadzono z zastosowaniem analizy PCR-SSCP. Zastosowane próbki o znanym genotypie pozwalały na określenie konformerów związanych z poszczególnymi wariantami insercji c.3020insC (Ryc.45)

Przebadano 82 osoby z grupy badanej pod względem występowania insercji c.3020insC oraz 154 osoby z grupy kontrolnej (materiał zdeponowany w Banku Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu). Częstości występowania badanych genotypów przedstawiono w tabeli 52 a częstość alleli w tabeli 53 . W badanych grupach zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w rozkładzie częstości alleli oraz genotypów w grupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelit.

Tabela 52. Częstość genotypów polimorfizmu c3020insC genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	Homozygoty c3020insC	Heterozygoty c3020insC	Typ dziki	razem
CD*	2 (6%)	5 (15%)	27 (79%)	34
IC	0 (0%)	3 (16%)	16 (84%)	19
CU*	1 (1%)	5 (17%)	23 (79%)	29
Kontrola	1 (1%)	8 (5%)	145 (94%)	154

*statystycznie istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną

Tabela 53. Częstość alleli polimorfizmu c3020insC genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	c3020insC	Typ dziki	Razem
CD*	9 (13%)	59 (87%)	68
IC	3 (8%)	35 (92%)	38
CU*	7 (10%)	51 (90%)	58
Kontrola	10 (3%)	298 (97%)	288

*statystycznie istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną kontrolą

- Substytucja c.2104C>T

Badanie substytucji c.2104C>T prowadzącej do zamiany aminokwasu R702W wykonano w grupie kontrolnej i grupie chorych. Po strawieniu produktów PCR wykonywano rozdział elektroforetyczny wraz z kontrolami dla poszczególnych wariantów oraz markerem wielkości (Ryc.42). Wśród 82 pacjentów analizowanych pod względem występowania substytucji c.2104C>T zaobserwowano 72 genotypy C/C oraz 120 genotypów C/T. Nie obserwowano występowania genotypów T/T. Częstości tych genotypów przedstawiono w tabeli 54 wraz z częstościami genotypów w grupie kontrolnej. Częstości alleli w badanych grupach przedstawiono w tabeli 55. W analizie statystycznej wykazano statystycznie istotną różnicę w częstości zarówno genotypów jak i alleli 2104C>T w grupie chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w stosunku do grupy kontrolnej

Tabela 54. Częstość genotypów polimorfizmu 2104C>T genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	C/T	C/C	Razem
CD*	6 (18%)	28 (82%)	34
IC	2 (11%)	17 (89%)	19
CU	2 (7%)	27 (93%)	29
Kontrola	6 (4%)	148 (96%)	154

*statystycznie istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną

Tabela 55. Częstość alleli polimorfizmu 2104C>T genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	Allel T	Allel C	Razem
CD*	6 (9%)	62 (91%)	68
IC	2 (5%)	36 (95%)	38
CU	2 (3%)	56 (97%)	58
Kontrola	6 (4%)	302 (96%)	308

*statystycznie istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną

- Substytucja c.802C>T

Badanie substytucji c.802C>T prowadzącej do zamiany aminokwasu P268S wykonano w grupie kontrolnej i grupie chorych (Ryc.41) Po trawieniu produktów PCR wykonywano rozdział elektroforetyczny wraz z kontrolami o znanym genotypie oraz markerem wielkości. Wśród 82 przebadanych pacjentów zaobserwowano 39 genotypów C/C, 31 genotypów C/T oraz 12 genotypów T/T. Częstości występowania tych genotypów w grupie badanej i kontrolnej przestawiono w tabeli 56 wraz z częstościami genotypów w grupie kontrolnej. W tabeli 57 przedstawiono częstości alleli w tym locus. W analizie statystycznej nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poszczególnych grupach chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak zauważyć należy występowanie różnic między grupami chorych z chorobą Leśniowskiego - Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelit. Różnice te występują zarówno w przypadku częstości genotypów jak i w przypadku częstości występowania alleli tego polimorfizmu. Zauważyć należy że częstości te w przypadku CD są

wyższe niż w grupie kontrolnej a w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelit - niższe. Taki rozkład częstości prowadzi do sytuacji gdzie nie ma istotnych różnic między badanymi grupami a grupą kontrolną.

Tabela 56. Częstość genotypów polimorfizmu 802C/T genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	C/C	C/T	T/T	Razem
CD*	13 (38%)	12 (35%)	9 (27%)	34
IC	9 (47%)	8 (42%)	2 (11%)	19
CU*	17 (59%)	11 (38%)	1 (3%)	29
Kontrola	74 (48%)	54 (35%)	26 (17%)	154

*statystycznie istotna różnica w częstości występowania genotypów między grupą chorych z chorobą Crohna a grupą chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelit

Tabela 57. Częstość alleli polimorfizmu 802C/T genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	C	T	Razem
CD*	38 (56%)	30 (44%)	68
IC	26 (68%)	12 (32%)	38
CU*	45 (78%)	13 (22%)	58
Kontrola	202 (66%)	106 (34%)	308

*statystycznie istotna różnica w częstości występowania alleli w grupie chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna a grupą chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelit

- Substytucja c.2722G>C

Badanie substytucji c.2722G>C prowadzącej do zamiany aminokwasu G908R wykonano w grupie chorych i grupie kontrolnej (Ryc.43). Po strawieniu produktów PCR wykonywano rozdział elektroforetyczny. Przebadano 82 pacjentów pod względem występowania

substytucji c.2722G>C i w tej grupie zaobserwowano 74 genotypy C/C oraz 8 genotypów C/T. Nie obserwowano występowania genotypów T/T. Częstości tych wariantów przedstawiono w tabeli 58 wraz z częstościami genotypów w grupie kontrolnej. Częstość alleli przedstawiono w tabeli 59. W przypadku wariantu c.2722G>C nie zaobserwowano statycznie istotnych różnic w badanych grupach.

Tabela 58. Częstość genotypów polimorfizmu 2722G/C genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	C/C	C/G	G/G	Razem
CD	0 (0%)	4 (12%)	30 (88%)	34
IC	0 (0%)	0 (0%)	19 (100%)	19
CU	0 (0%)	1 (3%)	28 (97%)	29
Kontrola	1 (1%)	9 (6%)	144 (97%)	154

Tabela 59. Częstość alleli polimorfizmu 2722G/C genu *NOD2* u chorych z NZJ i w grupie kontrolnej

Rozpoznanie	Allel C	Allel G	Razem
CD	4 (6%)	64 (94%)	38
IC	0 (0%)	38 (100%)	38
CU	1 (2%)	57(98%)	58
Kontrola	10 (3%)	298 (97%)	308

4.3. Podsumowanie wyników w zakresie oznaczeń wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15*:

- Obserwowano statycznie istotną różnicę w częstości występowania genotypów oraz alleli u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku polimorfizmów c.3020insC oraz 2104C>T.
- Obserwowano statycznie istotną różnicę w częstości występowania genotypów oraz alleli u chorych z CU w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku polimorfizmu c.3020insC.

- Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania badanych alleli w grupie chorych z nieokreśloną postacią nieswoistego zapalenia jelit w porównaniu z grupą kontrolną.
- Zaobserwowano różnicę częstości w występowaniu alleli i genotypów polimorfizmu 802C/T u chorych z CD a grupą chorych z CU.

V. Dyskusja

W zakresie różnych aspektów tematu głównego jakim są nieswoiste choroby zapalne jelit w piśmiennictwie pojawiły się ostatnio także zagadnienia dotyczące algorytmów diagnostyczno-terapeutycznych w tych chorobach. W celu zilustrowania tej tematyki Doktorantka przedstawia poniżej stanowisko opublikowane w *Pediatric Gastroenterology and Hepatology* w 2011 roku, które uwzględnia ustalenia Brytyjskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci (BSPGHAN) (147,148). Autorzy przypomnieli w skrócie definicję, epidemiologię, patogenezę, obraz kliniczny oraz diagnostykę choroby Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i niesklasyfikowanej postaci zapalenia jelita grubego (ang.: *indeterminate colitis* - IC). Po raz kolejny podkreślono konieczność jednoczesnego wykonywania gastroskopii i kolonoskopii u dzieci z podejrzeniem NZJ, zalecając pobieranie wycinków do badania histologicznego ze wszystkich „pięter” górnego (przełyk, żołądek, dwunastnica) oraz dolnego odcinka przewodu pokarmowego (jelito kręte, kątnica, wstępnica, poprzecznicca, zstępnica, esica oraz odbytnica). Zwrócono także uwagę na zasadność dodatkowego wykonywania badania bakteriologicznego w kierunku prątków u dzieci z podejrzeniem gruźlicy.

Autorzy wytycznych opracowali także algorytm postępowania leczniczego w CD i CU. W przypadku CD za leki pierwszego wyboru w indukcji remisji choroby uznano glikokortykosteroidy (GKS) doustne oraz wyłączne żywienie dojelitowe, ewentualnie antybiotykoterapię (metronidazol, cyprofloksacyne), aminosalicylany (mesalazynę, sulfasalazynę), budezonid, GKS dożylnie i azatioprynę. U chorych na CD oporna na leczenie należy rozważyć wdrożenie leczenia immunomodulującego. W podtrzymaniu remisji skuteczna może być azatiopryna, metotreksat, aminosalicylany lub leczenie biologiczne.

Zgodnie z wytycznymi ESPGHAN, w indukcji remisji CU o łagodnym przebiegu lub ograniczonego do lewej strony jelita grubego stosuje się mesalazynę (miejscowo lub ogólnie), a w postaciach ciężkich - GKS doustne. W przypadku ostrego ciężkiego zapalenia jelita grubego leczenie powinno obejmować stosowanie GKS dożylnie, antybiotyków, cyklosporyny dożylnie lub postępowanie chirurgiczne. W podtrzymaniu remisji zaleca się natomiast aminosalicylany lub azatioprynę.

Autorzy wytycznych podkreślają konieczność monitorowania stanu odżywienia, wzrastania oraz układu kostnego u chorych leczonych z powodu NZJ.

W 2010 roku opublikowano także zalecenia European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) dotyczące postępowania diagnostycznego i terapeutycznego w CD u dzieci. Główną zmianą w stosunku do Konsensusu ECCO z 2004 roku jest stwierdzenie, że w indukcji remisji CD u dzieci skuteczne jest wyłączenie żywienia enteralnego oraz stosowanie GKS, ale leczenie żywieniowe jest obciążone mniejszym ryzykiem wystąpienia skutków ubocznych i sprzyja lepszemu wzrastaniu. Ponadto uznano, że infliksymab jest skuteczny w indukcji i podtrzymaniu remisji CD. Autorzy wytycznych ECCO stwierdzili także, że w celu zapewnienia lepszej opieki pacjentom z CD konieczne jest utworzenie wielodyscyplinarnych zespołów w pediatrycznych ośrodkach gastrologicznych (160,212,275,262,287).

Zgodnie z wytycznymi, u pacjentów z podejrzeniem CD w badaniu podmiotowym i przedmiotowym należy uwzględnić ocenę dojrzewania oraz krzywych antropometrycznych wzrastania. Prawidłowe wyniki badań laboratoryjnych nie upoważniają do wykluczenia CD, natomiast wskaźniki stanu zapalnego jelit (kalprotektyna, laktoferyna) mogą być pomocne w kwalifikacji pacjenta do badań endoskopowych. Wstępne postępowanie diagnostyczne powinno obejmować wykonanie endoskopii górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego w znieczuleniu ogólnym. Za najważniejsze badanie obrazowe jelita cienkiego uznano natomiast MR, ponieważ pozwala ono ocenić obecność ropni i przetok w miednicy mniejszej. U pacjentów z prawidłowym wynikiem badania endoskopowego końcowego odcinka jelita krętego oraz u pacjentów, u których wykonanie innych badań obrazowych było niemożliwe lub niemięrodajne, należy rozważyć wykonanie endoskopii kapsułkowej.

Wyniki prospektywnych badań wskazują, że skuteczność budezonidu i prednizolonu w leczeniu łagodnej i umiarkowanej postaci CD jest podobna, aczkolwiek budezonid rzadziej wywołuje działania niepożądane. Zarówno prednizolonu/prednizonu, jak i budezonidu nie należy stosować w podtrzymaniu remisji. Nie potwierdzono także skuteczności mesalazyny, antybiotyków i probiotyków w indukcji remisji CD. Najskuteczniejsze w podtrzymaniu remisji są: tiopuryny, azatiopryna oraz metotreksat, a ich wprowadzenie już w czasie indukowania remisji zapewnia jej dłuższe trwanie. Infliksymab jest skuteczny w umiarkowanej i ciężkiej postaci CD odpornej na standardową terapię. Regularne leczenie biologiczne może zapewnić podtrzymanie remisji u pacjentów z dobrą wstępną odpowiedzią na leczenie infliksymabem, a także może być skuteczne w zamknięciu przetok. Zgodnie z zaleceniami ECCO, leczenie chirurgiczne należy rozważyć u pacjentów z CD oporną na leczenie farmakologiczne, a zwłaszcza u osób z opóźnieniem wzrastania i dojrzewania.

W materiałach zawierających dane ECCO opublikowano wyniki systematycznego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego farmakologicznego i żywieniowego leczenia NZJ u dzieci (239). Kryteria włączenia spełniły 103 publikacje. Autorzy przeglądu wyciągnęli wniosek, że na podstawie wiarygodnego piśmiennictwa dotyczącego dzieci i dorosłych należy koniecznie opracować wytyczne leczenia NZJ u dzieci.

Na łamach czasopism zagranicznych i polskich opublikowano prace zawierającą opis kilku przypadków dzieci z NZJ, które skutecznie zaszczepiono przeciwko ospie wietrznej w trakcie terapii immunomodulacyjnej (m.in. 6-merkaptopuryną) (15,70,100,205). Autorzy sugerują konieczność rewizji wytycznych ECCO z 2009 roku dotyczących diagnostyki i profilaktyki zakażeń oportunistycznych u chorych na NZJ, zgodnie z którymi szczepienia przeciwko ospie wietrznej są u tych chorych przeciwwskazane. (178,180,182)

Leach i wsp. (161) zmodyfikowali pediatryczną skalę oceny aktywności CD (PCDAI), wprowadzając dodatkowo ocenę stężenia białka C-reaktywnego (CRP). Na podstawie analizy zastosowania zmodyfikowanej skali PCDAI u 62 chorych autorzy wyciągnęli wniosek, że może ona stanowić krótkoterminowy wykładnik zmienności aktywności choroby, zwłaszcza dla celów badawczych. W piśmiennictwie (12,261) zwraca się uwagę na konieczność uwzględniania w diagnostyce NZJ nowych, nieinwazyjnych wskaźników tj. białek endogennych w kale, takich jak: kalprotektyna, laktoferyna czy kinaza pirogronianowa guza (M2-PK) i białko S100A12. (161,165) .

Nieswoiste choroby zapalne jelit to zmiany o niewyjaśnionej dotychczas etiologii. Najczęściej postuluje się współdziałanie czynników mikrobiologicznych, predyspozycji genetycznych oraz określonego profilu immunologicznego pacjenta (10,24,39,50,55,57,76,105,155,221,243). Zasadniczą kwestią jest wyjaśnienie czy rozwój procesu zapalnego rzeczywiście jest wynikiem reakcji zmienionej odpowiedzi układu immunologicznego na obecność antygeny (np. bakteryjnego) w jelicie. (277). Zapalenie prowadzi do uszkodzenia bariery jelitowej, zwiększenia jej przepuszczalności i w konsekwencji przenikania antygenów do krwi. W efekcie następuje rozwój i podtrzymanie permanentnego zapalenia. Brak ściśle określonego czynnika sprawczego jest istotnym utrudnieniem zarówno we wczesnym wykryciu choroby jak i w opracowaniu skutecznej metody leczenia. Olbrzymim problemem jest również stale rosnąca częstość zachorowania na omawiane choroby obserwowana na całym świecie jak i obniżanie się wieku zachorowania. Przyjmuje się, że szczyt zachorowań dotyczy młodych osób, pomiędzy 15 a 35 rokiem życia.

W ostatnich latach lawinowo rośnie liczba dzieci u których diagnozuje się chorobę zapalną jelit (77). Przyjmuje się, że aż ¼ nowych rozpoznań jest dokonywana w grupie pacjentów poniżej 18 r.ż (57,117,119). Analiza epidemiologiczna polskich dzieci wykazała, iż częstość zachorowania wynosi około 2,7/100000/ rok. U ¼ chorych postawienie rozpoznania miało miejsce przed 10 r.ż. Jednocześnie w populacji polskiej wyższa była zapadalność na colitis ulcerosa aniżeli na chorobę Leśniowskiego – Crohna (119). Wśród dzieci badanych w ramach niniejszej pracy wykazano natomiast nieco wyższą zapadalność na chorobę Leśniowskiego – Crohna, aniżeli na colitis ulcerosa czy colitis indeterminata (44% vs.33% vs. 23%). Pozostaje to w zgodności z pracą Nieuwenhuis i wsp. (194), w której również wykazano podobną tendencję. Dominuje przekonanie iż częstość zachorowań na chorobę Leśniowskiego – Crohna wzrasta, natomiast na colitis ulcerosa nie zmienia się. Częstość występowania określonej jednostki chorobowej wydaje się zależeć również od wieku. Ponad 50% analizowanych w rozprawie pacjentów było w wieku 11 – 15 lat (56,5%). Podobne wyniki do tych, które zostały przedstawione w niniejszej analizie rozprawy doktorskiej - uzyskali Heyman i wsp. (105). W badaniu obejmującym ponad 1300 pacjentów w wieku 1-17 lat zapadalność na chorobę Leśniowskiego - Crohna była istotnie wyższa w porównaniu z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i colitis indeterminata. Jednak różnice te pojawiały się dopiero w grupie wiekowej 9 – 15 lat, podczas gdy wśród dzieci w wieku 1 – 8 lat częstość występowania poszczególnych jednostek chorobowych z grupy NZJ była porównywalna.

Rosnąca skala problemu w populacji dziecięcej zmusza do intensywnego poszukiwania rzeczywistej przyczyny choroby, jak również doboru szybkich, nieinwazyjnych a jednocześnie wystarczająco czułych i swoistych metod diagnostycznych. Wczesne rozpoznanie choroby jest bowiem kwestią kluczową dla podjęcia prawidłowego leczenia i w konsekwencji zabezpieczenia jak najlepszego rozwoju dziecka. Późne rozpoznawanie choroby prowadzi często do powikłań, wyniszczenia organizmu i konieczności przeprowadzenia zabiegu chirurgicznego. Postawienie diagnozy opiera się przede wszystkim na połączeniu badań endoskopowych, radiologicznych, histopatologicznych i laboratoryjnych. Niezbędna jest pełna kliniczna ocena pacjenta. Ponieważ nieswoiste choroby zapalne jelit objawiają się okresami zaostrzeń i remisji konieczna jest stała i systematyczna kontrola aktywności choroby. „Złotym standardem” diagnostycznym nieswoistych chorób zapalnych jelit jest kolonoskopia. Inwazyjność wykonywanych badań i konieczność wielokrotnego ich

powtarzania skłania do poszukiwania nowych, nieinwazyjnych i bezbolesnych metod, które będą jednocześnie zdolne dokładnie ocenić obecność i/lub stopień aktywności procesu zapalnego.

Duże nadzieje wiąże się z markerami stanu zapalnego oznaczanymi w kale (8,13,31,34,41,44,52,74,79,80). Wskaźniki te cechują się wysoką czułością i swoistością. Ich oznaczanie spełnia warunek nieinwazyjności, dlatego nie wywołuje sprzeciwu pacjenta (zwłaszcza pediatrycznego) i jest stosunkowo łatwe w wykonaniu (materiałem analizowanym jest kał). Przeprowadzono dotychczas wiele badań potwierdzających przydatność wskaźników zapalnych w trafnym diagnozowaniu nieswoistej choroby zapalnej jelit oraz określaniu jej stopnia aktywności. W odróżnieniu od markerów zapalnych oznaczanych we krwi są one typowo swoiste dla procesów zapalnych toczących się w przewodzie pokarmowym, nie zaś dla zapaleń ogólnoustrojowych. Określanie zmian stężeń tych związków umożliwia wykrycie fazy początkowej stanu zapalnego wtedy, gdy jest on jeszcze klinicznie bezobjawowy. Dzięki temu możliwe jest szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia. Jednocześnie poziom markerów nie wzrasta w przypadku zmian czynnościowych przewodu pokarmowego. Jest to więc prosta, bezbolesna i stosunkowo tania metoda dla wyodrębnienia pacjentów z rzeczywistymi zmianami organicznymi w przewodzie pokarmowym. Idealny marker stanu zapalnego jelit musi być wysoce swoisty dla nieswoistych zapaleń jelit i umożliwiać odróżnienie omawianej jednostki od innych chorób przewodu pokarmowego. Poziom markerów powinien bezpośrednio odzwierciedlać stopień nasilenia zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym, co przydatne może być w monitorowaniu stanu zdrowia pacjenta (195,202,206). Ograniczenie przydatności dotychczas stosowanych markerów zapalnych wynika z tego, że ich poziom wzrasta w odpowiedzi na rozwój stanu zapalnego o różnej etiologii (np. nowotwór). Ponieważ jednak nowotwory przewodu pokarmowego są niezwykle rzadkie wśród dzieci, markery zapalne wydają się być doskonałym narzędziem dla wykrycia i oceny stopnia nasilenia nieswoistych zapaleń jelit. Celem niniejszej pracy była ocena przydatności jednocześnie (równolegle) oznaczanych trzech markerów stanu zapalnego: dimerowej formy kinazy pirogronianowej guza (M2-PK), laktoferyny oraz kalprotektyny w ocenie aktywności procesu chorobowego w jelitach u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Jest to pierwsze tego typu badanie w klinice pediatrycznej, które miało na celu oszacowanie, czy zaproponowane parametry mają szansę (przy łącznym oznaczaniu) stać się powszechnie stosowanym panelem oceny stanu zdrowia i/lub choroby dzieci z podejrzeniem

NZJ. Oceniano także powiązanie pomiędzy analizowanymi markerami a tradycyjnymi wskaźnikami stanu zapalnego, badanymi w krwi pacjenta.

- **Markery stanu zapalnego oznaczane w kale u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit**

Ocena korelacji pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby (NZJ) a zmianą poziomu ocenianych jednocześnie markerów zapalnych w kale stanowiła (obok dwóch innych tj. mikrobiologicznego i genetycznego) główny cel rozprawy doktorskiej. Wychodząc z tego założenia przetestowano dwa dość dobrze poznane markery kałowe procesów zapalnych w jelitach tj. laktoferynę i kalprotektynę oraz dołączono do nich oznaczanie stosunkowo nowego markera jakim jest kinaza pirogronianowa guza (M2-PK). Nowością w pracy było przede wszystkim jednoczesne oznaczanie tych markerów u wszystkich zakwalifikowanych do badania dzieci z trzema podstawowymi formami nieswoistych chorób zapalnych jelit. Laktoferyna w grupie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit oceniona została po raz pierwszy już w 1993 roku (267). Od tego czasu wielokrotnie potwierdzono przydatność tego wskaźnika w analizowanej grupie pacjentów. Znaczna liczba publikacji dotyczyła jednak pacjentów dorosłych. (126,136,159) Za to obecnie dostępne są jedynie nieliczne prace oceniające przydatność tego markera w grupie pediatrycznej (28,126,299). Ich autorzy wykazali jednakże dobrą korelację pomiędzy skalą aktywności choroby (oceniającą według wskaźników pediatrycznych), a stężeniem laktoferyny w kale. Wyniki u pacjentów dorosłych nie zawsze są równie zachęcające. Badania Schröder i wsp. (252) nie potwierdziły omawianej korelacji w żadnej postaci nieswoistego zapalenia jelit (również z uwzględnieniem kalprotektyny). Kolejny z ocenianych parametrów to kalprotektyna, która jest najlepiej dotychczas przebadanym zapalnym wskaźnikiem kałowym w grupie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (144). Jest to jednocześnie jedyny obecnie marker rekomendowany przez organizację ECCO (EUROPEAN CROHN'S AND COLITIS ORGANIZATION). Korelacja stężeń kalprotektyny ze stopniem zaostrzenia choroby została wielokrotnie potwierdzona, również w populacji dziecięcej, w tym także w badaniach polskich (8,141,199). Aktualnie pojawiły się jednak doniesienia, iż kalprotektyna jest mniej przydatnym markerem diagnostycznym u dzieci z NZJ, aniżeli w populacji dorosłej (80). Kobelska – Dubiel wykazała silną korelację stężenia kalprotektyny w kale z aktywnością kliniczną choroby u dzieci z colitis ulcerosa, natomiast całkowity jej brak w chorobie Leśniowskiego – Crohna (141). Identyczną zależność prezentuje w swojej pracy

Bremner (31). Jako trzeci element panelu oznaczeń w zakresie markerów procesu zapalnego jelit analizowano również przydatność M2-PK, dimerowej formy enzymu zaangażowanego w podstawowe procesy energetyczne komórki. Pierwotnym jego przeznaczeniem było wczesne wykrywanie nowotworów przewodu pokarmowego (99,101,102,137,179,300,305). Wydaje się jednak, że jest on również wartościowym markerem nasilenia zmian zapalnych w przebiegu NZJ. Dotychczas przeprowadzono jedynie dwie analizy oceniające przydatność tego markera u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit: jedną u dzieci, a drugą u osób dorosłych (42,49). Aktywność markera dobrze korelował ze stopniem aktywności choroby u osób dorosłych, zarówno w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna jak i colitis ulcerosa. U pacjentów w stanie remisji aktywność markera była istotnie niższa aniżeli w przypadku aktywnej postaci choroby. Tymczasem w analizie oceniającej aktywność M2-PK w populacji dziecięcej wykazano lepszą korelację aktywności M2-PK z aktywnością choroby u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (42). U pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna korelacja była obserwowana z mniejszą istotnością, jednocześnie obserwowano podwyższoną aktywność kinazy w kale dzieci w stanie remisji. Przyjmuje się, że pozornie dobry stan kliniczny pacjenta może być mylący w odniesieniu do wartości markera. Podwyższony poziom znacznika w kale może wyprzedzać i sygnalizować nadchodzące zaostrzenie stanu zapalnego, nie dające jeszcze objawów klinicznych. Potencjał diagnostyczny tego nowego markera w populacji dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wymaga więc nadal badań z zastosowaniem właściwie przygotowanych protokołów badawczych.

W wynikach pracy doktorskiej wszystkie analizowane kałowe markery zapalne dobrze korelowały ze stopniem aktywności klinicznej choroby u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit, ocenianą według typowych skal aktywności procesu chorobowego. Zależności te obserwowano zarówno w przypadku choroby Leśniowskiego – Crohna jak i we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Poziom markerów były w istotnej większości podwyższone u pacjentów z zaostrzeniem choroby. Wyniki w zakresie poziomów tych markerów w kale, przyjęte za zakresy norm były charakterystyczne dla pacjentów w stanie remisji lub w przypadku łagodnej postaci choroby.

U ponad 50% dzieci z NZJ aktywność M2-PK była podwyższona. U większości z tych pacjentów rozpoznano umiarkowaną i ciężką postać choroby. Istotnym jest fakt, iż skuteczne leczenie prowadziło do spadku aktywności enzymu do wartości fizjologicznej. Minimalna

badana aktywność wyniosła <1 U/ml, maksymalna natomiast 3897,80 U/ml. U dzieci z brakiem aktywnej choroby czy stanem łagodnym aktywność markera M2-PK w kale była w większości prawidłowy. Podobnie jak w przypadku kinazy pirogronianowej, również stężenie kalprotektyny wydaje się istotnie korelować z aktywnością choroby. Minimalne jej stężenie w kale wynosiło 1,6 mg/l, natomiast maksymalne 53,75 mg/l. U 53% dzieci stężenie markera nie przekroczyło normy. Aż u 85% z nich obserwowano remisję lub brak aktywności choroby. Podwyższone stężenie było charakterystyczne dla umiarkowanej i ciężkiej postaci choroby. Minimalne stężenie laktoferyny w kale dzieci z NZJ wyniosło 0,27 μ g/ml, natomiast maksymalne 1132,84 μ g/ml. Również w przypadku tego wskaźnika obserwowano identyczną zależność jak dla opisywanych powyżej dwóch innych markerów. Stężenie w zakresie normy obserwowano u pacjentów z CU w dobrym stanie, natomiast wzrastało wraz z zaostrzeniem stanu zapalnego.

Ponieważ jednoczasowa ocena trzech omawianych markerów w kale wyraźnie koreluje ze stopniem aktywności klinicznej choroby to wydaje się ona stanowić także potencjalnie użyteczne narzędzie oceny kontroli i skuteczności wdrożonego leczenia. Mogłaby stać się również pośrednim narzędziem dla ogólnej oceny stanu zdrowia pacjenta z NZJ. Mimo obserwowanej w przypadku każdego markera istotności statystycznej z zaostrzeniem choroby, dokładna ocena wykazała iż najlepszym kandydatem dla oceny aktywności procesu zapalnego w przypadku choroby Leśniowskiego – Crohna wydaje się być M2-PK. Tylko w przypadku tego markera istotne statystycznie różnice aktywności w kale obserwowano nie tylko pomiędzy brakiem aktywności choroby, a umiarkowanym (laktoferyna) i ciężkim stadium choroby (kalprotektyna, laktoferyna) lecz również pomiędzy stadium łagodnym a umiarkowanym. Mimo, że potwierdzenie tej tezy wymaga oczywiście dalszych obserwacji, to już teraz można zaryzykować stwierdzenie, że M2-PK jest najczulszym wskaźnikiem aktywności procesu zapalnego u dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna. U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego aktywność procesu i stan pacjenta najlepiej ocenić można badając laktoferynę, której stężenie – jak już uprzednio zaznaczono – zmienia się w zależności od stadium choroby. Za pomocą M2-PK i kalprotektyny można było w wynikach prezentowanych w rozprawie odróżnić tylko pacjentów w stadium łagodnym od stanu ciężkiego NZJ. Oznaczanie poziomu markerów nie jest badaniem tanim, zwłaszcza w grupie pacjentów zdiagnozowanych, u których poziomy markerów w kale są z reguły bardzo wysokie. Z tego względu istnieje konieczność

wielokrotnego rozcieńczania prób, co generuje wysokie koszty badania (koszt pojedynczego oznaczenia to około kilkudziesięciu złotych). Także więc, względy ekonomiczne uzasadniają dalsze poszukiwania bardziej specyficznego markera, którego poziom w kale korelowałby możliwie najsilniej i najczulej z minimalnym już stopniem zaostrzenia stanu zapalnego w jelicie.

Aktywność M2-PK i stężenie laktoferyny wydają się być parametrami niezależnymi od długości trwania procesu chorobowego. Istnienie tego typu zależności mogłoby znacząco wpłynąć na korelację: aktywność choroby – poziom markerów. Na te parametry wpływ wywierałby bowiem nie tylko stopień zaostrzenia zmian zapalnych, lecz również okres trwania choroby. Zależność tego typu obserwowano w przypadku kalprotektyny ($p=0,023$). Ewentualne włączenie kalprotektyny do zasad i panelu badań diagnostycznych NZJ wymagałoby uwzględnienia podwyższonego jej stężenia w kale u dzieci z stosunkowo dawno postawionym rozpoznaniem. Istotna dla praktyki klinicznej jest z kolei obserwacja, iż wiek dziecka (w momencie rozpoznania choroby) wydaje się nie mieć istotnego wpływu na poziom żadnego z analizowanych markerów.

W rozprawie przeanalizowano również występowanie ewentualnej zależności pomiędzy poziomem markerów procesu zapalnego w kale a typem jednostki chorobowej. Nie wykazano istotnej różnicy w poziomie markerów pomiędzy colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna. Większość opracowań naukowych dotyczących markerów stanu zapalnego nie rozwija tematu ewentualnych różnic pomiędzy tymi jednostkami chorobowymi, skupiając się na korelacji poziomu markera ze stopniem aktywności choroby. Nieliczne opracowania analizujące ten aspekt prezentują wnioski podobne do uzyskanych w niniejszej rozprawie (28,42). Inne analizy wskazują natomiast na potencjalne różnice w stężeniu laktoferyny u pacjentów z colitis ulcerosa oraz chorobą Leśniowskiego – Crohna (139). Istotne różnice były natomiast obserwowane w wyniach rozprawy doktorskiej w zakresie markerów zapalnych jelita pomiędzy obydwoma jednostkami chorobowymi (tj. CD i CU) a colitis indeterminanta (IC). To spostrzeżenie może być pomocną wskazówką w procesie diagnostycznym. Colitis indeterminanta jest specyficznym rozpoznaniem, wprowadzonym przez patomorfologów (279) stawianym u dzieci, u których standardowo prowadzona diagnostyka nie pozwala na postawienie jednoznacznej diagnozy. Z reguły pacjenci są w dość dobrym stanie klinicznym. Rozpoznanie colitis indeterminanta uważane jest powszechnie za przejściowe i dotyczy okresu różnicowania się zmian w jelitach w kierunku choroby

Leśniowskiego – Crohna lub colitis ulcerosa. W omawianej grupie dzieci konieczne jest więc stałe monitorowanie ewolucji zmian chorobowych zachodzących w ścianie jelita. Istnieje bowiem prawdopodobieństwo, iż wzrost poziomu markerów w kale może wskazywać na różnicowanie się colitis indeterminata w inną jednostkę chorobową szybciej aniżeli wskazują na to tradycyjnie wykonywane badania diagnostyczne.

Wychodząc z założenia możliwości zmiany rozpoznania w aspekcie wstępnego rozpoznania colitis indeterminata w czasie trwania procesu chorobowego u dzieci z NZJ, poddano ich badaniom umożliwiającym ocenę korelacji pomiędzy badanymi markerami zapalenia jelit, a tradycyjnymi wskaźnikami stanu zapalnego we krwi. Rutynowe badania krwi należą bowiem do podstawowych analiz wykonywanych u pacjentów hospitalizowanych. Zaostrzenia stanu zapalnego ocenia się standardowo za pomocą takich parametrów jak: OB, CRP, liczba płytek krwi, fibrynogen i innych. Stan kliniczny pacjenta pośrednio można ocenić zaś dzięki takim wskaźnikom jak: stężenie żelaza i hemoglobiny we krwi czy albumin w osoczu. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazały dobrą korelację pomiędzy badanymi markerami stanu zapalnego jelit, a większością tradycyjnych (oznaczanych we krwi) parametrów stanu zapalnego. Korelację jelitowych markerów zapalnych z największą liczbą parametrów stanu zapalnego obserwowano u dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna. Poziom oznaczanych wskaźników rósł wraz ze wzrostem CRP, OB, stężeniem fibrynogenu we krwi oraz liczbą płytek krwi, a obniżała się wraz ze wzrostem hemoglobiny we krwi oraz z poziomem albumin w osoczu. W colitis ulcerosa wysokie wartości jelitowych markerów zapalnych obserwowano u pacjentów z podwyższonym poziomem OB i fibrynogenu we krwi. Spadały one natomiast wraz ze wzrostem stężenia hemoglobiny. Najslabiej poziom markerów kałowych korelowało z poziomem markerów zapalnych we krwi u pacjentów z colitis indeterminata. Prawdopodobnie brak korelacji wynikał ze zmiennej dynamiki przebiegu choroby w tej grupie pacjentów. Z uwagi na nowatorski charakter jednoczasowego badania trzech markerów kałowych, nie znaleziono wiele danych w piśmiennictwie dotyczących ewentualnej korelacji pomiędzy poziomem tych związków, a tradycyjnymi markerami zapalnymi. W pracy Kobelskiej – Dubiel i wsp. (141) wykazano korelację pomiędzy aktywnością choroby ocenianą według skali Truelove – Wittsa u dzieci z CU, a biochemicznymi wskaźnikami stanu zapalnego; nie wykazano jej natomiast dla choroby CD ocenianej w skali PCDAI. Nie badano jednak bezpośredniej korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi, a stężeniem kalprotektyny w kale. Borkowska

wykazała brak korelacji pomiędzy parametrami zapalnymi we krwi a stężeniem laktoferyny w kale (28). Wyniki te różniły się od obserwacji poczynionej w niniejszym opracowaniu. Być może przyczyną braku korelacji w cytowanej pracy była niższa liczebność populacji chorych dzieci. Wyniki uzyskane przez Walkera wykazują istotną korelację pomiędzy laktoferyną a tradycyjnymi wskaźnikami stanu zapalnego u dzieci i młodzieży (336). Prawdopodobnie stosunkowo krótki okres jaki minął od wprowadzenia do diagnostyki NZJ markera M2-PK jest przyczyną małej liczby opublikowanych badań na temat jego korelacji z parametrami stanu zapalnego we krwi. Rozbieżności w uzyskanych wynikach i niewielka liczba przeprowadzonych dotychczas badań wskazuje na konieczność dalszych analiz w zakresie oceny korelacji: markery kałowe *versus* markery zapalne we krwi u pacjentów z NZJ.

Aby wyeliminować ewentualny wpływ dodatkowych czynników na zmiany poziomów markerów zapalnych w kale przeprowadzono korelację pomiędzy stężeniem tych substancji a wiekiem i płcią badanych dzieci z NZJ i nie wykazano w tym zakresie żadnych, statystycznie istotnych zależności. Przyjąć więc można iż parametry te nie powinny wpływać na wartości otrzymanych wyników.

Ustalenie rzeczywistej przydatności badanych markerów kałowych może być jednym z kluczowych elementów poszukiwania, nowego – wysoce czułego i możliwie najmniej inwazyjnego schematu diagnostyczno – terapeutycznego w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci. W tej grupie pacjentów najsilniej rysuje się bowiem konieczność maksymalnego ograniczenia inwazyjności prowadzonych badań przy jednoczesnym opracowaniu nieinwazyjnego, odpowiednio szybkiego i dokładnego algorytmu wykrywania choroby i monitorowania jej przebiegu. Konieczność poddania się inwazyjnym zabiegom powoduje naturalny sprzeciw i potęguje strach dziecka przed chorobą. Przy dowiedzionym silnym wpływie czynnika psychicznego na dalszy jej przebieg konieczne jest więc maksymalne ograniczenie działań stresogennych (33,38). Ocena stanu zdrowia dziecka dokonywana, choćby częściowo, na podstawie poziomu markerów zapalnych w kale jest – co potwierdzają wyniki przedstawione w rozprawie - badaniem szybkim, dokładnym i całkowicie nieinwazyjnym. Założyć można, iż metoda ta mogłaby znaleźć zastosowanie w ocenie skuteczności odpowiednio dobranej terapii zachowawczej lub nawet interwencji chirurgicznej. Nie bez znaczenia jest wielokrotnie już wykazana przydatność markerów kałowych do różnicowania zmian czynnościowych od organicznych. Oznaczanie ich w kale mogłoby pełnić więc rolę badania przesiewowego w kierunku nieswoistych chorób zapalnych

jelit, dzięki czemu grupa dzieci z zespołem jelita nadwrażliwego uniknęłyby np. badań endoskopowych.

Wprowadzenie markerów kałowych do panelu badań diagnostycznych w grupie pacjentów z chorobą zapalną jelit przyczyniłoby się do znacznego ograniczenia kosztów medycznych i zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych związanych zarówno z inwazyjną naturą zabiegów endoskopowych wykonywanych w znieczuleniu ogólnym. Należy zaznaczyć jednak, iż proponowane rozwiązanie nie jest pozbawione wad. Markery zapalne oznaczane w kale nie są bowiem wyłącznie swoiste dla stanu zapalnego wynikającego z NZJ. Podwyższenie ich wartości może być spowodowane każdym procesem zapalnym toczącym się w przewodzie pokarmowym. Podwyższone są one również np. w odpowiedzi na rozwijający się nowotwór jelita grubego. Sporadyczne występowanie zmian nowotworowych w populacji dziecięcej zwiększa jednak przydatność omawianych markerów w rozpoznaniu u nich choroby jelit o podłożu zapalnym. Być może wzbogacenie diagnostyki nieswoistych zapaleń jelit o jednoczesne oznaczenia kilku zweryfikowanych markerów stanu zapalnego zwiększy jej dokładność. Przeprowadzona dotychczas ocena jednoczesnego oznaczenia M2-PK i kalprotektyny wykazała obniżenie czułości badania do 64%, jednak – co istotne – z jednoczesnym wzrostem swoistości do 98% (125,127,128). W niniejszej rozprawie, z uwagi na założone cele i odpowiednio dobrany materiał badawczy oraz nieplanowany dobór grupy kontrolnej nie oszacowano czułości i swoistości poszczególnych testów. Z tego względu na podstawie uzyskanych wyników nie można ocenić jak na omawiane parametry testu wpłynie jednoczesne wykonanie kilku oznaczeń. Wykazano natomiast istnienie silnej i dodatniej korelacji pomiędzy wszystkimi analizowanymi markerami zapalnymi w kale. Oznacza to, że wzrostowi jednego markera towarzyszy wzrost dwóch pozostałych. Z tego względu przyjąć można, iż łączna analiza zapalnych markerów kałowych (pakiet, panel markerów) skutkować będzie zwiększoną zdolnością do detekcji choroby i szybkiej oceny stanu pacjenta.

Analizując krytycznie uzyskane w rozprawie wyniki przyjąć można, że kolejnym ograniczeniem użyteczności prezentowanego badania jest zastosowanie częściowo subiektywnych skal oceny aktywności procesu chorobowego. Bazują one częściowo na odczuciach i opiniach własnych pacjenta, przez co nie mogą być obiektywne dla oceny stanu chorego (próg bólu, uwarunkowania psychiczne), choć odpowiadają definicji jakości życia wg WHO. Ograniczenia te należy uwzględnić oceniając korelację: poziom markera – zaostrenie choroby. Również konieczność wielokrotnych rozcieńczeń laktoferyny i M2-PK

w celu uzyskania mierzalnego (ilościowego) wyniku (zwłaszcza u pacjentów w aktywnym stadium choroby) stwarza określone, techniczne problemy laboratoryjne i wydłuża czas analizy oraz zwiększa jej koszt.(172,185)

Mimo wspomnianych ograniczeń, oczywiste zalety wynikające z łącznego, jednoczasowego badania markerów w kale czynią je obiecującymi składowymi procesami diagnostycznym u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.

W rozprawie przebadano szczegółowo wpływ czynników mikrobiologicznych na przebieg nieswoistych chorób zapalnych jelit i zagadnienie to stanowi kolejny element poruszany w dyskusji. W analizowanej grupie pacjentów oceniono występowanie i liczebność wybranych mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym. Od wielu już lat trwa bowiem poszukiwanie jednego, konkretnego mikroorganizmu, a także grup drobnoustrojów będących „czynnikiem spustowym” rozwoju choroby tj. NZJ. Celem niniejszej analizy było prześledzenie czy rodzaj rozpoznania i zaostrzenie choroby powodują różnice zmian jakościowych i ilościowych w poszczególnych grupach bakterii autochtonicznych. Badano również występowanie korelacji pomiędzy czynnikiem bakteryjnym a klasycznymi wskaźnikami stanu zapalnego i trzema markerami oceniającymi jelitowy proces zapalny.

Wieloczynnikowe podłoże nieswoistych chorób zapalnych jelit stwarza konieczność wieloczynnikowej oceny zależności pomiędzy parametrami mikrobiologicznymi, immunologicznymi, zapalnymi oraz genetycznym. Wyniki takiego postępowania mają służyć dla opracowania efektywnego schematu diagnozowania choroby, monitorowania stanu zdrowia oraz leczenia pacjenta.(133). Z tego względu postanowiono - jako kolejny główny cel - przeanalizować stosunki jakościowe i ilościowe wybranych mikroorganizmów jelitowych u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Poszukiwano ponadto ewentualnych zależności pomiędzy czynnikiem mikrobiologicznym a poziomem wskaźników zapalnych w kale i aktywnością kliniczną choroby, ocenianą według odpowiednich skal.

Udział bakterii w nieswoistych zapaleniach jelit wydaje się obecnie sprawą bezdyskusyjną. Za poglądem tym przemawiają wyniki licznych obserwacji klinicznych i doświadczeń. Badania na modelu zwierzęcym wykazały, że zapalenie jelit (colitis) nie występuje w środowisku bezbakteryjnym. Transgeniczne myszy, pozbawione IL – 2 i IL – 10 nie wykazywały żadnych objawów choroby, przebywając w środowisku jałowym (249,250,294). Wprowadzenie fizjologicznej, niepatogennej mikroflory do ich środowiska wewnętrznego

wywołało rozwój stanu zapalnego (11,82,92,108,131,138,149,184,255). U myszy z już rozwiniętą chorobą zapalną jelit obserwowany jest odmienny - niż u osobnika zdrowego - sposób kolonizacji. W chorobie, bakterie komensalne kolonizują powierzchnię błony śluzowej jelita, podczas gdy w stanie homeostazy występują w dominującej większości na powierzchni śluzu (242,265). Wykazano także, iż kontakt zdrowej części jelita z bakteriami zawartymi w treści kałowej doprowadzał do rozwoju stanu zapalnego (53,236). Potwierdzony jest fakt pojawiania się zmian chorobowych w miejscu najsilniejszego nagromadzenie drobnoustrojów.

Kolejnym argumentem świadczącym o istotnej roli czynnika bakteryjnego w chorobach zapalnych jelit jest skuteczność antybiotyków w łagodzeniu stanu zapalnego towarzyszącego chorobie. Nadal poszukuje się odpowiedzi na pytanie czy czynnik bakteryjny bierze udział w rozwoju choroby, czy też gra większą rolę w podtrzymywaniu stanu zapalnego. Być może nadmierne namnażanie określonych mikroobów wtórnie podrażnia błonę śluzową jelita, podtrzymując stan zapalny (50,53). Pojawiają się również opinie, iż obserwowana w omawianej grupie pacjentów dysbioza jest nie przyczyną, a skutkiem choroby. Winę przypisuje się zwłaszcza nierzadko agresywnym i oddziałującym bezpośrednio na mikrobiota metodom leczenia. Gdyby teza ta znalazła potwierdzenie, ocena charakteru zmian mikrobiologicznych w trakcie choroby nadal stanowiłaby kluczową kwestią dla zapewnienia powodzenia procesu terapeutycznego. Odpowiednia modyfikacja stosunków jakościowych i ilościowych bakterii jelitowych mogłaby stać się bowiem jednym z elementów skutecznej terapii.

Próby wykorzystania probiotyków w terapii chorób jelit były podejmowane już wielokrotnie, i to z dobrym rezultatem. Zadawalające efekty osiągnięto zwłaszcza w pierwotnej i wtórnej profilaktyce zapalenia zbiornika kałowego (pouchitis), stosując probiotyczną mieszankę 8 szczepów bakterii kwasu mlekowego VSL#3 (53,174,183). Podtrzymanie remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wydaje się również realne do osiągnięcia z pomocą probiotykoterapii. Probiotyczny szczep *Escherichia coli Nissle 1917* podtrzymywał remisję równie skutecznie co mesalazyna czy balsalazyna (149,225). Dotychczas nie wykazano z kolei skuteczności probiotyków u pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna (273).

Mnogość argumentów, uzasadniających istotną rolę drobnoustrojów w omawianej jednostce chorobowej skłania ku prowadzeniu dalszych analiz. Poszukuje się więc zarówno jednego, konkretnego drobnoustroju zaangażowanego w rozwój choroby jak i dominujących

grup mikroorganizmów w badaniach eksperymentalnych i klinicznych (90,166,222,254,263,277). W niniejszej rozprawie podjęto próbę oceny słuszności obu przedstawionych założeń. Analizowano więc liczebność poszczególnych drobnoustrojów u pacjentów z określoną jednostką chorobową oraz w różnym stadium aktywności klinicznej choroby. Kolejnym elementem pracy było przyporządkowanie mikroorganizmów w grupy, w zależności od pełnionych przez nie funkcji i dalsza analiza wspomnianych zależności. Przyjęty sposób klasyfikacji do grup wiązał się z licznymi ograniczeniami. Znikomą bowiem część oznaczanych bakterii można jednoznacznie łatwo przyporządkować do grupy korzystnych lub niekorzystnych dla zdrowia. Znaczna ich część odgrywa nie pojedynczą, a wielorakie funkcje w przewodzie pokarmowym (166). Zdecydowano się na utworzenie konkretnych grup, kierując się najbardziej charakterystycznymi właściwościami poszczególnych bakterii. Określone drobnoustroje mogą być w stanie homeostazy obojętne dla gospodarza, natomiast przy zaistnieniu odpowiednich warunków stać się patogenem. Przykładowo niepatogenne bakterie *Escherichia coli* spp. wywierają pożądany, immunomodulacyjny wpływ na organizm, z drugiej natomiast strony są zdolne m.in. do produkcji enzymów nowotworogennych (230). Ze względu na udowodniony, korzystny wpływ na układ odpornościowy bakterie odgrywające podobne funkcje zaliczono w niniejszej pracy do grupy o właściwościach immunostymulujących.

Uważa się, iż jednoznacznie korzystne dla zdrowia człowieka są jedynie bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Zostały one w niniejszej pracy zaliczone do grupy o właściwościach ochronnych. Dodatkowo u analizowanych pacjentów badano obecność i liczebność szczepów *Lactobacillus* zdolnych do produkcji nadtlenu wodoru, szczególnie pożądanych ze względu na silnie antybakteryjne właściwości. W grupie bakterii proteolitycznych znalazły się drobnoustroje wywierające jednoznacznie negatywny wpływ na zdrowie. Ten – nieco sztuczny podział miał na celu określenie, które typy mikroorganizmów dominują u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Poszukiwano również mikrobów występujących w zredukowanej liczbie, których niedobór mógłby być przyszłościowo uzupełniany z wykorzystaniem terapii probiotycznej. Konieczne było również ustalenie różnic w obecności i liczebności czynnika mikrobiologicznego w colitis ulcerosa, chorobie Leśniowskiego–Crohna oraz colitis indeterminata. Panuje pogląd, iż w chorobie Leśniowskiego–Crohna drobnoustroje odgrywają większą rolę, aniżeli we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Fakt ten może sugerować odmienne podłoże patogenetyczne obu jednostek chorobowych. Należy tu wspomnieć chociażby postulowany udział *Mycobacterium*

paratuberculosis (MAP) w inicjacji choroby. Prątek ten jest często spotykany w wycinkach jelit osób z chorobą Leśniowskiego – Crohna, jak również w mleku chorych, karmiących matek. Wyizolowano go również z przewodu pokarmowego krów cierpiących na chorobę Johna, podobnej w swej symptomatologii do choroby CD (235).

Mając powyższe doniesienia z piśmiennictwa na uwadze postanowiono ocenić wieloaspektowo wybrane markery bakteryjne w kale dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit. W pierwszej kolejności analizowano, czy występuje zależność pomiędzy liczebnością i obecnością ocenianych mikroorganizmów a wiekiem badanych pacjentów. Przedmiotem analizy była również zależność składu mikrobiota od czasu jaki upłynął od postawienia diagnozy. Postanowiono zbadać czy długość trwania choroby u dziecka przyczyni się do istotnych zmian w składzie bakterii jelitowych. W obu analizowanych aspektach nie wykazano istotnych statystycznie zależności. Wydaje się więc, iż w analizowanej grupie dzieci ani wiek, ani czas trwania choroby nie wpływają znacząco na obserwowane zmiany mikroflory jelitowej.

Wbrew przypuszczeniom kompozycja mikrobiota w grupie analizowanych pacjentów pediatrycznych nie odbiegała znacząco od przyjętej normy ilościowej (86).

W kale chorych dzieci wykazano silnie zwiększoną liczebność drożdżaków, istotnie obniżoną liczebność ochronnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz redukcję łącznej liczby bakterii. W badanej populacji stwierdzono wzrost liczebności grzybów drożdżopodobnych w kale. Podobne obserwacje w grupie polskich dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego poczyniła Zwolińska – Wcisło (307). Częstość występowania znamiennej kolonizacji grzybiczej była istotnie wyższa w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną (78% vs. 7%). Obserwacja ta jest o tyle istotna, iż rzeczywiste prawdopodobieństwo infekcji grzybiczej rosło proporcjonalnie do czasu trwania choroby. W cytowanej pracy zastosowanie leków antygrzybiczych przyczyniło się wyraźnie do poprawy stanu zdrowia pacjentów pediatrycznych. Dodatkowo obserwacje te są ważne z tego powodu, iż dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit są w grupie zwiększonego ryzyka rozwoju kandydozy. Bezobjawowa kolonizacja grzybicza przewodu pokarmowego notowana jest u kilkudziesięciu procent społeczeństwa. Czynnikiem predysponującym do rozplemu grzybów jest między innymi dysbioza przewodu pokarmowego oraz przewlekłe stosowanie antybiotyków. Oba czynniki są charakterystyczne dla opisywanej w rozprawie grupy pacjentów. Kolonizacja drożdżakami istotnie zwiększa ryzyko infekcji grzybiczej, charakteryzujących się ciężkim przebiegiem i trudnych do leczenia. Z tego względu konieczne jest monitorowanie liczebności tych

mikroorganizmów i racjonalne stosowanie antybiotyków.(232). Drożdżak *Candida albicans* stymuluje wydzielanie przeciwciał przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), wykorzystywanych jako jeden z markerów diagnostycznych choroby Leśniowskiego – Crohna. Grzyby drożdżopodobne mogą więc być również postrzegane jako bezpośredni producent antygenów wywołujących nadmierną aktywację układu immunologicznego jelit (264).

Należy rozważyć również możliwość potencjalnego udziału czynnika mykologicznego w inicjowaniu choroby u osób podatnych genetycznie. W świetle powyższych rozważań niezbędne jest prowadzenie dalszych badań oceniających czy zwiększona liczebność grzybów drożdżopodobnych jest wynikiem czy też jedną z przyczyn nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Kolejnym, wykazanim w pracy odchyleniem, było znaczne zmniejszenie liczebności pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Bifidobacterium*. Bakterie te stanowią podstawę dla produkcji większości preparatów probiotycznych. Ich obecność i prawidłowe stężenie w jelitach jest niezwykle istotne w zachowaniu homeostazy organizmu. Według Demulle u osoby zdrowej, odżywiającej się w sposób zbilansowany, liczebność tych drobnoustrojów nie powinna być mniejsza aniżeli 44% (59). Tak wysoka koncentracja hamuje jednocześnie nadmierne namnażanie patogenów z rodzaju *Clostridium* i innych, utrzymując ich liczebność na stałym, niskim poziomie 7%. Przykładowo, obniżenie liczebności *Bifidobakterii* poniżej 20% skutkuje namnożeniem *Clostridium spp.* aż do 9%. Właściwa liczba mikroorganizmów z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu odpowiedniej puli kwasów organicznych, a w konsekwencji utrzymywania pH niekorzystnego dla rozwoju flory chorobotwórczej. Kolejną ich zaletą jest hamowanie aktywności enzymów uczestniczących w procesie karcinogenezy oraz stymulacja odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Nie bez znaczenie jest fakt, iż silne zdolności adhezyjne do nabłonka jelita umożliwiają mikroorganizmom z rodzaju *Bifidobacterium* zajmowanie receptorów, co daje bezpośredni efekt przeciwdrobnoustrojowy. Redukcja liczebności tych prozdrowotnych bakterii sprzyja więc aktywizacji procesów karcinogenezy oraz ułatwia patogenom kolonizację ściany jelita. Jednocześnie osłabieniu ulegają reakcje immunologiczne układu GALT. W konsekwencji pojawiają się idealne warunki dla rozwoju i podtrzymania stanu zapalnego (64,67)

Jak powyżej wskazano, ograniczenie liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* idzie w parze z nadmiernym namnożeniem beztlenowych bakterii typu *Clostridium spp.*

Przeprowadzona analiza poszczególnych bakterii ujawniła istotnie wyższą liczebność *Clostridium spp.* u dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna, w porównaniu z pozostałymi podgrupami. Podczas gdy u dzieci z colitis ulcerosa oraz colitis indeterminata liczebność omawianych patogenów zdecydowanie znajdowała się w normie, to w przypadku rozpoznania choroby Leśniowskiego - Crohna na jej granicy. Obserwowane różnice w liczbie bakterii o uznanych właściwościach chorobotwórczych, wydają się potwierdzać tezę o odmiennych mechanizmach sprawczych obu jednostek chorobowych. Być może w rozwój i podtrzymanie stanu zapalnego w colitis ulcerosa oraz w chorobie Leśniowskiego – Crohna zaangażowane są różne elementy, włączając odmiennie czynniki mikrobiologiczne. Proteolityczna, beztlenowa pałeczka *Clostridium* była dotychczas przedmiotem wielu analiz u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Zwraca się uwagę zwłaszcza na wysoką zdolność do produkcji toksyn, jak również adherencji do nabłonka jelitowego. W wyniku rozkładu białka powstaje amoniak będący przyczyną alkalizacji środowiska. *Clostridium* produkują ponadto wysoko szkodliwe związki, takie jak indol czy skatol. Gatunek *Clostridium difficile* jest odpowiedzialny za rozwój rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego, choroby obarczonej szczególnie wysoką śmiertelnością. *Clostridium* wydaje się również odgrywać istotną rolę w zaostrzeniu stanu klinicznego u pacjentów w stanie remisji (76). Mimo, iż zaburzenia liczebności *Clostridium* nie osiągnęły progu istotności statystycznej, do roli tego drobnoustroju w etiologii choroby powinno przykładać się wzmożona uwagę.

Kolejną obserwowaną nieprawidłowością była istotnie zredukowana łączna liczba bakterii. Fakt ten, podobnie jak powyżej przytoczone, wskazuje na ewidentne zaburzenia w obrębie ekosystemu jelitowego. Ponieważ najistotniejszą redukcję obserwowano w odniesieniu do *Bifidobakterii*, wydaje się iż zmniejszenie liczebności miało miejsce przede wszystkim w grupie bakterii autochtonicznych, o właściwościach ochronnych. Logicznym staje się więc wnioskowanie, iż eliminacja stwierdzanej dysbiozy i przywrócenie pożądanych stosunków bakteryjnych w ekosystemie przewodu pokarmowego jest jednym z niezbędnych elementów terapii u dzieci z NZJ.

W kolejnym etapie postanowiono ocenić zależność pomiędzy liczebnością poszczególnych drobnoustrojów a stopniem aktywności klinicznej NZJ. U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego tego typu korelacja nie była obserwowana. W przypadku choroby Leśniowskiego – Crohna obserwowano istotną zależność pomiędzy zaostrzeniem choroby a łączną liczbą bakterii, liczebnością grzybów drożdżopodobnych oraz bakterii z rodzaju *Clostridium*. Jest to kolejny argument świadczący za silniejszym wpływem

mikrobiota na rozwój i/lub podtrzymanie procesu zapalnego w CD, aniżeli w przypadku colitis ulcerosa. Być może złożoność interakcji bakteryjnych wpływających na rozwój i podtrzymanie stanu zapalnego jest przyczyną niepowodzeń terapii probiotycznej w tej jednostce chorobowej. Na podstawie przeprowadzonych badań trudno ocenić, czy obserwowane zaburzenia wpływają negatywnie na aktywność choroby czy też są bezpośrednim wynikiem pogarszenia się stanu pacjenta. Nadmierne namnożenie proteolitycznych bakterii z rodzaju *Clostridium* czy grzybów drożdżopodobnych jest sytuacją wysoce niepożądaną w przewodzie pokarmowym. Jednoczesna redukcja łącznej liczby bakterii wskazuje na uprzywilejowane warunki dla dalszego rozwoju flory patogennej. Nie można wykluczyć, iż obserwowane zależności bakteryjne są wynikiem wielokrotnych terapii antybiotykami czy chemioterapeutykami, wywierającymi negatywny wpływ na całość mikrobiota i promującymi rozwój mikroorganizmów szkodliwych. Być może jednak nadmierny rozwój bakterii odpowiadających za procesy rozkładu białek wpływa negatywnie na stan pacjenta, uszkadzając nabłonek jelitowy (produkcja toksycznych metabolitów) oraz alkalizując środowisko jelit. Nadmierny rozwój drożdżaków, będący z reguły wynikiem dysbiozy bakteryjnej, prowadzi do większej ilości wydzielanych toksyn. Tak więc, konieczne są dalsze analizy oceniające rzeczywistą rolę omawianych mikroorganizmów w zaostrzeniu stanu chorobowego. Można założyć, iż obserwowane nieprawidłowości nie są rzeczywistą przyczyną a jedynie skutkiem choroby, zaś eliminacja dysbiozy przyczynić się może do poprawy stanu zdrowia dzieci z NZJ.

W następnym etapie pracy badano czy poszczególne grupy bakterii korelują ze stopniem aktywności zmian chorobowych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż u pacjentów z zaostrzeniem choroby Leśniowskiego – Crohna obserwowana jest silna redukcja bakterii ochronnych, z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Drobnoustroje te odgrywają nie tylko istotną rolę w eliminacji potencjalnych patogenów z ustroju, lecz również produkują szereg istotnych dla homeostazy jelit związków (krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, aminy). Stymulując syntezę mucyny przyczyniają się jednocześnie do prawidłowego funkcjonowania bariery jelitowej. Zmniejszenie ich ilości jest więc pierwszym krokiem do nadmiernego namnożenia patogenów, uszkodzenia ciągłości błony śluzowej jelita, a w konsekwencji rozwoju stanu zapalnego (73). Przeprowadzone przez Macho Fernandez badanie na modelu zwierzęcym (173) wykazały antyzapalny wpływ szczepów *Lactobacillus*, a szczególnie peptydoglikanu bakteryjnego. Związek ten zapobiegł rozwojowi zapalenia jelit u myszy z brakiem genu *NOD -2*, stymulując lokalną odpowiedź immunologiczną i

wydzielanie IL – 10. Aktywnym czynnikiem peptydoglikanu okazał się być muropeptyd o strukturze M-tri-lys. Autorzy wskazują na konieczność izolowania aktywnych substancji ze szczepów probiotycznych i ich oceny jako potencjalnych terapeutyków u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. Wydaje się więc, iż spadek liczebności szczepów o właściwościach przeciwzapalnych może być bezpośrednią lub pośrednią przyczyną zaostrzenia stanu zapalnego u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit. Podobną tendencję obserwowano w grupie z colitis ulcerosa, jednakże nie osiągnęła ona poziomu istotności statystycznej. Wydaje się jednak, iż w świetle aktualnych badań poczyniona przez w/w autorów obserwacja ta jest wysoce istotna w dalszej terapii NZJ (192,225,231).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że liczba bakterii koreluje ze zmianą poziomu markerów zapalnych w kale. Wraz ze wzrostem poziomów wszystkich markerów zapalnych zmniejszała się liczba pożądanych, immunomodulacyjnych drobnoustrojów z rodzaju *Bacteroides*. Aktywność M2-PK i stężenie laktoferyny kształtował się odwrotnie proporcjonalnie do liczebności bakterii ochronnych, jak również samego szczepu *Bifidobacterium*. W odniesieniu do czynników patogennych obserwowano odwrotną zależność – im wyższa była liczebność drożdżaków i bakterii proteolitycznych tym wyższa aktywność i wyższy poziom markerów zapalnych w kale. Zależność pomiędzy aktywnością kliniczną choroby a zaburzeniami w obrębie ekosystemu jelitowego powinny stać się przedmiotem dalszych, intensywnych badań w analizowanej grupie pacjentów. Wykazana wzajemna korelacja w układzie: aktywność choroby – marker stanu zapalnego – bakterie jelitowe może stać się przyczynkiem do opracowania nowego, skutecznego schematu diagnozowania i oceny stanu zdrowia pacjentów z NZJ. Z liczebnością poszczególnych drobnoustrojów w kale chorych dzieci najlepiej wydają się korelować aktywność M2-PK oraz stężenie laktoferyny. Być może jednoczasowa analiza tych wskaźników oraz liczebności bakterii ochronnych, proteolitycznych, z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i drożdżaków może stać się wartościowym badaniem diagnostyczno-prognostycznym mówiącym o kierunku zmian zachodzących u pacjenta w czasie trwania choroby. Inwazyjność metod diagnostycznych i terapii stosowanych u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit jest istotnym problemem, zwłaszcza w grupie dzieci. Jak już przedstawiono w innych rozdziałach rozprawy niejasny obraz kliniczny sprawia dodatkowo, iż nie zawsze udaje się jednoznacznie określić rodzaj jednostki chorobowej. W konsekwencji pojawiają się problemy z oceną stanu zdrowia dziecka i opracowaniem właściwej terapii. Konieczność bolesnych zabiegów potęguje też lęk i przyczynia się do obniżenia jakości życia chorego dziecka. Aktualnie trwają

intensywne poszukiwania nieinwazyjnych, lecz wystarczająco czułych i swoistych markerów, umożliwiających choćby częściową ocenę stanu pacjenta. Przedstawione w niniejszej pracy markery zapalne wydają się prezentować wystarczającą czułość dla detekcji choroby i dobrze korelować ze stopniem jej aktywności klinicznej. Największym problemem jest jednak zbyt niska ich swoistość. Poziom tych związków jest bowiem podwyższony w przypadku każdego stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym. Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna wykazała natomiast istotne różnice w poziomie wybranych bakterii pomiędzy obydwojma jednostkami chorobowymi. Poczyniona obserwacja wymaga oczywiście potwierdzenia i rozwinięcia w kolejnych analizach klinicznych. Wydaje się jednakże, iż korelacja oznaczania markerów i bakterii mogłaby stanowić ciekawy i istotny krok w kierunku właściwej diagnostyki i optymalizacji terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit.

W oparciu o przedstawioną powyżej dyskusję i przegląd piśmiennictwa (275,276,277) – z odniesieniem do uzyskanych wyników własnych podjęto próbę zbiorczego zestawienia relacji pomiędzy mikrobami, genami i immunologią w przebiegu różnych postaci NZJ – rozpoczynając rozważania od CD. W patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna istotną rolę w inicjacji choroby odgrywają, u chorych podatnych genetycznie procesy inicjowane przez bakterie, doprowadzające do uszkodzenia bariery śluzówkowej i zaburzenia równowagi jelitowej odpowiedzi immunologicznej (243). Enterocyty błony śluzowej jelita kontaktują się z olbrzymią liczbą antygenów pokarmowych, bakteryjnych oraz innych drobnoustrojów. Prawidłowy nabłonek jelitowy, z rozwiniętymi desmosomami i produktami komórek kubkowych, peptydami i glikoproteinami mucynowymi, limfocytami i IgA zapewnia skuteczną barierę przeciwko czynnikom obcym w świetle przewodu pokarmowego. Obecność bakterii komensalnych, zapobiega nadmiernemu rozwojowi drobnoustrojów patogennych (216).

W warunkach zdrowia bakterie kolonizujące jelito nie przylegają do błony śluzowej. U chorych z CD wykazano zwiększoną ilość przylegających do powierzchni i wewnątrzkomórkowych bakterii w nabłonku okrężnicy (53,271). W śluzówce jelita chorych na CD stwierdzono zwiększoną liczbę różnorodnych antygenów bakteryjnych (104,263). Wykazano, że nadmierna liczba bakterii *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides* i *Fusobacterium* może przyczyniać się do wystąpienia pooperacyjnych nawrotów CD (214). Stwierdzono, że jeden ze związanych ze śluzówką szczepów *E.coli* może zmieniać przepuszczalność jednowarstwowych komórek jelit (231).

Flora bakteryjna jest niezbędnym i prawdopodobnie kluczowym czynnikiem rozwoju CD u podatnych chorych (4,216). Według Amre i wsp. (4) egzogenne infekcje, które przełamują barierę śluzówkową, powodują utratę tolerancji na endogenne mikroorganizmy i antygeny pokarmowe, co w konsekwencji prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, który inicjuje procesy patogenetyczne w CD.

Podolsky (216) sugerował, że przewlekłe, nawracające zapalenie jelita może być efektem stymulacji śluzówkowego układu odpornościowego przez produkty bakterii komensalnych bytujących w świetle jelita. Poparciem tej tezy są wyniki badań na modelach mysich z colitis wywołanym za pomocą interwencji genetycznych oraz badania kliniczne na ludziach (216, 222). Rozwój „spontanicznego” zapalenia błony śluzowej okrężnicy u szczurów i myszy wymaga obecności flory bakteryjnej. Proces ten nie występuje w żadnej z linii mutantów utrzymywanych w pozbawionym drobnoustrojów środowisku, ale pojawia się natychmiast po kolonizacji myszy bakteriami komensalnymi (222). Badania na modelach mysich idą w parze z doświadczeniem klinicznym. Antybiotyki o szerokim spektrum działania i probiotyki mają udowodnioną skuteczność kliniczną u chorych z CD (225,270). Integralność błon śluzowych w przewodzie pokarmowym jest utrzymywana dzięki równowadze między cytokinami pozapalnymi i immunoregulatorowymi (4,180). W tkankach chorych z CD stwierdzono podwyższenie stężenia IL-1, TNF (ang.: Tumor Necrosis Factor – TNF) IL-6, IL-8 oraz obniżone stężenia cytokin immunoregulatorowych (82,184).

Pomimo opisanego postępu wiedzy danych na temat patogenezы CD nie można wytłumaczyć jedynie w oparciu o stwierdzaną nierównowagę Th1/Th2 oraz wzrost aktywności cytokin prozapalnych przy jednoczesnym spadku aktywności cytokin immunoregulatorowych, ponieważ sama choroba może powodować tę nierównowagę (4, 216).

W ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w zakresie genetyki nieswoistych chorób zapalnych jelit zwłaszcza choroby Leśniowskiego-Crohna. Od chwili zidentyfikowania w 2001 roku genu *NOD2/CARD15*, naukowcy otrzymali impuls do podjęcia starań zmierzających do wyjaśnienia powiązań hipotetycznej osi patogenezы w chorobie Leśniowskiego-Crohna obejmującej: bakterie – odpowiedź immunologiczną – gen (produkt genu, mutacje w genie). Hugot i wsp.(110) sugerowali, że warianty *NOD2* zwiększają podatność na CD prawdopodobnie przez nadmierną aktywację NF-κB. Ogura i wsp. (196,197) wysunęli hipotezę, że *NOD2*, który ulega ekspresji na monocytach, może działać jako wewnątrzkomórkowy receptor dla

bakteryjnych lipopolisacharydów LPS i/lub innych produktów bakteryjnych, przynosząc sygnał na makrofagi, co prowadzi do aktywacji NF- κ B i transkrypcji genów regulatorowych. Autorzy ci udowodnili, że mutacje białka NOD2 powodują defektywną indukcję NF- κ B w odpowiedzi na LPS i sugerowali, że niedobór w rozpoznawaniu produktów bakterii przez białka-warianty NOD2 może skutkować nasiloną odpowiedzią zapalną układu odpornościowego. Sugerowali oni również, że białka-warianty NOD2 nie są zdolne do stymulacji IL-10 i prowadzą do braku regulacji „w dół”, czyli zmniejszenia procesów zapalnych, co może skutkować rozwojem nadreaktywności na patogeny (196,197,198).

Ogura i wsp (196) stwierdzili, że wariant Leu1007fsinsC powoduje deficyt zdolności wykrywania bakteryjnych lipopolisacharydów (*Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Campylobacter* i *Neisseria gonorrhoea*) w środowisku żołądkowo-jelitowym u chorych z CD. Deficyt ten może nasilać odpowiedź zapalną układu odpornościowego (196). Chamaillard i wsp. (39) wykazali, że cytozolowy CARD15 skutecznie wykrywa bakteryjny peptydoglikan (PGN), przypominając mechanizm nadzoru białkowego rozpoznawania PGN u *Drosophila* (39).

Domena LRRs *CARD15* (LRRs, ang. leucine-rich repeats) umożliwiająca reakcję (odpowiedź) na lipopolisacharydy bakteryjne i peptydoglikany, jest niezbędna dla rozpoznawania składowych patogenu i indukcji odpowiedzi swoistej dla patogenu. Białko NOD2 pozbawione domeny LRRs reaguje nadmierną aktywacją NF- κ B (197). Trzy główne warianty – mutacje w obrębie genu *NOD2/CARD15* (Leu1007fsinsC, Arg702Trp i Gly908Arg) wykazują deficyt w aktywacji NF- κ B w odpowiedzi na składowe bakterii, ukazując jednolity mechanizm działania dla wszystkich wariantów *NOD2/CARD15* związanych z CD (24). W jaki sposób mutacje *NOD2* i osłabiona aktywacja NF- κ B warunkują podatność na CD? Prawdopodobnie „klucz” tkwi w domenach strukturalnych *NOD2/CARD15*, zwłaszcza w LRRs.

Możliwa jest homologia funkcji *CARD15* z roślinnymi białkami oporności na choroby (R)(320). Aktualnie zarówno geny białek R jak i gen *CARD15* klasyfikowane są w rodzinie genów CATERPILLER (CATERPILLER, ang. *CARD*, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats) (197,251,284). Produkty tych genów zaangażowane są w utrzymanie bariery błon śluzowych (247,285,292).

LRRs w genach białek R, podobnie jak rodzina receptorów Toll - like rozpoznają związane z patogenem molekule i aktywują ścieżki transdukcji sygnałowej wrodzonego układu

odpornościowego, które indukują ekspresję licznych genów odpowiedzi immunologicznej, w tym cytokiny zapalne (182). Rozpoznanie molekuł związanych z patogenem przez receptory prowadzi do aktywacji ścieżki sygnałowej NF-κB (24). Przy braku liposacharydów bakteryjnych, zarówno prawidłowe białko NOD2, jak i białko pozbawione LRR, powodują porównywalną aktywację NF-κB. NF-κB jest uważany za jeden z głównych elementów zaangażowanych w aktywację kaskady stanu zapalnego, obserwowanej w CD (250). Wymuszona oligomeryzacja NOD2 indukuje aktywację NF-κB (197).

U chorych na CD możliwe są zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe „ścieżki sygnałowe” interakcji drobnoustrój-gospodarz. Receptory (toll-like) rozpoznają związane z patogenem jednostki molekularne w celu zainicjowania ścieżki sygnałowej NF-κB. Aktywowany receptor rekrutuje białko MyD88 (szpikowy czynnik różnicowania 88), które jest związane z kinazą związaną z receptorem interleukiny 1 (IRAK). IRAK jest następnie fosforylowana i wiąże się z białkiem łączącym - czynnikiem 6 związanym z receptorem TNF (TRAF6). Prowadzi to do fosforylacji kinazy κB (IKK) i następczej dysocjacji aktywnego NF-κB i IκB. IκB ulega degradacji w proteosomie po uprzedniej ubiquitynacji. Aktywny NF-κB wędruje do jądra komórkowego i indukuje aktywację transkrypcji wielu genów prozapalnych. NOD2 działa jako wewnątrzkomórkowy receptor dla wielu związanych z drobnoustrojami molekuł. Przez interakcje CARD-CARD białka NOD wiąże się z białkami łączącymi RICK (kinazą serynowo – treoninową) lub RIP2, prowadzi to w konsekwencji do aktywacji kaskady sygnałowej NF-κB (24,216). Spektrum mediatorów, które aktywują tę drogę obejmuje również cytokiny prozapalne np.: IL-1 i TNF (171,185,216).

Zewnątrzkomórkowe receptory toll-like i wewnątrzkomórkowe NOD2 działają jako receptory „rozpoznające szablony” w regulacji śluzówkowej wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na drobnoustroje jelitowe. Tym samym, zmniejszona aktywacja NF-κB, spowodowana mutacjami LRRs NOD2, może się wiązać z niewystarczającym unieszkodliwianiem drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych. Może to skutkować zwiększeniem produkcji innych cytokin prozapalnych, produkowanych w wyniku interakcji komórek błon śluzowych, zaangażowanych w jelitową odpowiedź immunologiczną/zapalną i zaburzać homeostazę jelitowego śluzówkowego układu odpornościowego (20,23,24,244). Uważa się, że aktywacja ścieżki sygnałowej NF-κB w odpowiedzi na składowe bakteryjne, powoduje ochronę gospodarza przed atakującymi drobnoustrojami. Zmutowane myszy pozbawione TNF-α lub receptora toll-like, charakteryzują się zmniejszoną aktywacją NF-κB, co powoduje zwiększoną

podatność na inwazję drobnoustrojów (278). Aktywacja białkowego regulatora transkrypcji NF- κ B jest powszechną drogą prowadzącą do produkcji mediatorów stanu zapalnego, włączając w to różnorodne cytokiny i chemokiny (m. in. TNF- α), które biorą udział w jelitowej odpowiedzi zapalnej (177). Moduluje ona również odporność na programowaną śmierć komórkową (apoptozę). Wykazano, że nadekspresja *NOD2* nie wywołuje apoptozy sama w sobie, ale nasila apoptozę wywoływaną przez ekspresję kaspazy 9 (114,115,197).

Kontynuując dyskusję na temat relacji pomiędzy procesami immunologicznymi, dysbiozą a predyspozycją genetyczną w nieswoistych chorobach zapalnych jelit raz jeszcze podkreślić należy, że dotychczas brak jednoznacznych dowodów na proste dziedziczenie mendlowskie w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Powszechnie uważa się, że za ryzyko wystąpienia CD oraz przebieg choroby odpowiedzialnych jest wiele genów i ich produkty (177,293). Część zidentyfikowanych loci dla nieswoistych zapaleń jelit wykazuje specyficzne powiązania z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU, colitis ulcerosa) lub CD, niektóre loci IBD wykazują sprzężenia zarówno z CU jak i z CD (177,216,293). Na ekspresję choroby Leśniowskiego-Crohna wpływają liczne geny, co powoduje trudności w identyfikacji pojedynczego locus determinującego podatność na chorobę. Z powodu heterogenności genetycznej choroby, często wyniki badań tego rodzaju zależności nie są powtarzalne w kolejnych badaniach (292,297).

W ostatnich latach przebadano wiele genów kandydatów dla choroby Leśniowskiego-Crohna. Pierwszym oznaczonym locus podatności dla CD był region pericentromeryczny na chromosomie 16, określony jako IBD1. Zidentyfikowany został przez Hugota i wsp. w 1996 roku (111). Cavanaugh (2001) przedstawił ostateczne dowody na związek IBD1 z CD oparte o wyniki uzyskane z międzynarodowego badania genetycznego, obejmującego 613. rodzin z IBD (37). Z powodu dużej liczby rodzin, obejmującej 12. odrębnych grup z 8. krajów, przeprowadzono substratyfikację i potwierdzono, że locus IBD1 jest powiązany wyłącznie z CD, i że zwiększone powinowactwo alleli było obserwowane zarówno wśród kohort żydowskich, jak i nie-żydowskich (37).

Hugot i wsp. w 2001 roku odkryli związek dwóch alleli o polimorfizmie mikrosatelitarnym D16S3136 z CD (110). Gen *NOD2* w tym samym czasie został niezależnie sklonowany przez Ogura i wsp. (196) jako homologiczny do *NOD1*. Badacze ci poprzez analizę klonów BAC określili, że gen *NOD2* znajduje się na chromosomie 16 w regionie 16q12

i zawiera 12 kodujących eksonów. Sekwencja genu od 1 do 11 eksonu ma wielkość 163319 pz (wg EMBL, GenBank) (101).

Analiza mRNA metodą Northern blot wykazała, że gen *NOD2* u ludzi ma najsilniejszą ekspresję w leukocytach krwi obwodowej, gdzie wykryto transkrypty o wielkości 7 kb i 5,5 kb. Badania prowadzone metodą RT-PCR wykazały, że ekspresja genu *NOD2/CARD15* dotyczy przede wszystkim monocytów. Ogura i wsp. zidentyfikowali również wariant *NOD2* kodujący 1,013-aminokwasowe białko, które nazwali *NOD2B* (196).

Poprzez analizę genomowej bazy danych dla homologów *NOD1* przy zastosowaniu 5-prime RACE i RT-PCR, Ogura i wsp. otrzymali cDNA kodujące *NOD2* (196). Analiza sekwencyjna wskazywała, że kodowane przez gen *NOD2* białko NOD2 złożone jest z 1040 aminokwasów. Składa się z dwóch N – końcowych domen *CARD* (*CARD*, ang. caspase recruitment domain) (miejsca 28 – 220), centralnej domeny oligomeryzacji wiążącej nukleotydy NBD (NBD, ang. nucleotide-binding domain) (miejsca 273 – 577) oraz 10. karboksy końcowych podwójnych powtórzeń bogatych w leucynę LRRs (LRRs, ang. leucine-rich repeats) (miejsca 744 – 1020). Białko NOD2 jest homologiczne z NOD1 w 34%. Obecność dwóch domen rekrutacji kaspaz w NOD2 doprowadziła do zmiany w mianownictwie z NOD2 na CARD15 (CARD15, ang. Caspase recruitment domain containing protein 15) (197).

Udowodniono, że CARD15 jest członkiem rodziny białek wewnątrzkomórkowych, które wykazują homologię strukturalną z roślinnymi białkami R (pośredniczą w odporności przeciwko chorobom gospodarza na patogeny) (113). CARD15 był trzecim zidentyfikowanym członkiem tej rodziny, do której należą APAF1 (APAF1, ang. Apoptotic protease activating factor 1, lokalizacja na chromosomie 12q23) i NOD1 (NOD1, ang. NOD1 protein, lokalizacja na chromosomie 7p15-p14) (10). Ekspresja APAF1 i NOD1 jest szeroka – obejmuje wszystkie tkanki, ekspresja CARD15 jest ograniczona do monocytów krwi obwodowej (20,113).

W ostatnim czasie wykazano homologię *NOD2/CARD15* z genami CATERPILLER (CATERPILLER, ang. *CARD*, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats) (251). Grupa CATERPILLER obejmuje geny wykryte u wyższych organizmów, w tym: ssaków (m. in. u ludzi: *CARD15*, *NOD1*, *NALP2-NALP14*, *CLAN*; u małp – *NALP5*), owadów oraz roślinne białka R (284). Produkty tych genów zaangażowane

są w utrzymanie bariery błon śluzowych. Pełniejszego wyjaśnienia wymaga ich udział w etiopatogenezie wielu chorób o podłożu autoimmunologicznym (251).

Badania genu *NOD2/CARD15* u chorych z CD doprowadziły do identyfikacji mutacji w jego strukturze. Hugot i wsp. (110) zidentyfikowali wiele polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) w obrębie genu *CARD15* i udowodnili, że trzy SNPs, w tym mutacja zmiany kształtu (SNP 13 – L1007fsinC) i 2 mutacje nonsensowne (SNP8 – R702W i SNP12 – G908R) są związane z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Niezależna identyfikacja jednej z tych mutacji (L1007fsinC) przez Ogura i wsp. (201) oraz potwierdzenie jej występowania u chorych z CD przez Hampe i wsp. (95) potwierdziły znaczenie genu oraz były inspiracją do wyjaśniania jego funkcji.

Mutacja L1007fsinC zlokalizowana jest w rejonie kodującym powtórzenia bogate w leucynę, w domenie C-końcowej białka NOD2. Polega na insercji 1 pz (cytozyny) w pozycji 3020 (c3020insC), w eksonie 11 genu *NOD2*. Jej efektem jest przesunięcie ramki i powstanie kodonu przedwczesnej terminacji translacji w kodonie 1007. Na skutek mutacji wielkość białka *NOD2* ulega redukcji z 1040 aminokwasów do 1007 aminokwasów (196).

Genetyka populacji *CARD15/NOD2* badana była przez Ogura i wsp. (196), którzy stwierdzili uprzywilejowaną transmisję mutacji c3020insC od heterozygotycznych rodziców do chorych na CD dzieci. Częstość mutacji c3020insC wynosiła 8,4% u Żydów i 8,1% u innych grup etnicznych rasy białej. Częstość w grupie kontrolnej wynosiła 4,0%. Ryzyko genotypowe u krewnych dla heterozygot i homozygot c3020insC wynosiło odpowiednio 1,5 i 17,6 (196).

W populacji europejskiej chorych z CD częstość występowania alleli DSAs wynosi 18 - 20%, w grupie kontrolnej 6 - 7%. Przynajmniej jeden *CARD15* DSA jest obecny u 30 - 40% pacjentów z CD z Europy północnej i u ok. 14% osób z grup kontrolnych (110,164). Posiadanie jednej kopii allelu ryzyka powoduje względnie niewielki (2. do 4. krotny) wzrost ryzyka zachorowania, posiadanie zaś dwóch kopii allelu ryzyka zwiększa ryzyko zachorowania 20. – 40. krotnie (24). Dla wariantu *CARD15* Leu1007fsinC porównywalne częstości alleli obserwowano u Żydów chorych na CD (7.3%) i chorych nie mających pochodzenia żydowskiego (8,4%) (26). Częstość alleliczna mutacji Gly908Arg w *CARD15* była znacząco wyższa u chorych z CD pochodzenia żydowskiego (10.2%), w porównaniu z chorymi o innym pochodzeniu (4.3%). Dla Arg702Trp w *CARD15* chorzy z CD nie mający

pochodzenia żydowskiego prezentują znacząco wyższą częstość alleliczną (10.7%) w porównaniu z Żydami chorymi na CD (2.6%) (24). Sugimura i wsp. (267) wykazali, że haplotyp 268S, który nie posiada trzech głównych DSAs, ale zawiera dodatkowy wariant (IVS8+158; JW1), to jest mutację C do T w sekwencji palindromowej w intronie 8. regionu łączącego predysponuje do rozwoju CD u Żydów Aszkenazyjskich, czego nie stwierdzono w innych populacjach.

Inoue i wsp. (115) w badaniach przeprowadzonych wśród 350. japońskich chorych na CD, 272. chorych na UC i 292 osób z grupy kontrolnej, nie stwierdzili żadnej osoby, która byłaby nosicielem trzech głównych alleli ryzyka występujących wśród osobników rasy białej. W innym dużym badaniu Yamazaki i wsp. (303) w podobnej analizie 483. japońskich pacjentów z chorobą Crohna nie zidentyfikowali żadnej z 3. mutacji. Autorzy konkludowali, że *NOD2/CARD15* nie jest czynnikiem podatności na chorobę Crohna u Japończyków. Croucher i wsp. (49) w badaniach chorych na CD w Korei Południowej nie stwierdzili związku *CARD15* i CD. Wśród Afroamerykanów z CD nosicielstwo 3. głównych alleli ryzyka było znacząco niższe w porównaniu z ich częstością w populację kaukaskiej i grupie kontrolnej (25).

Powyższe wyniki wskazują, że zmienność genetyczna, która może predysponować niektóre populacje ludzkie do rozwoju CD, może nie występować w innych populacjach i że powszechne warianty *NOD2* diagnozowane u chorych rasy białej z CD nie są związane z CD w populacjach afrykańskiej i azjatyckiej.(46). Vermaire i wsp. (297) przedstawili wyniki badań molekularnych chorych z CD w populacji kanadyjskiej. W pracy pojawił się „akcent” polski – wśród objętych badaniem było 3. chorych pochodzenia polskiego (297). Dobrowolska-Zachwieja i wsp. w 2004 roku poddali badaniu 114 polskich chorych na CD. Stwierdzili występowanie wariantu mutacji *NOD2/CARD15* (P268S) u 66% chorych (grupa kontrolna 23%). Wśród chorych z obecną mutacją, zmiany w obu allelach stwierdzano u 22% (grupa kontrolna 3%), obecność mutacji w jednym allelu wykryto u 34% chorych (grupa kontrolna 20%) (61). Częstość występowania wariantów genu *NOD2/CARD15* u dzieci z CD jest zbliżona do obserwowanej u chorych dorosłych (47,157,164,285,297).

Korelacje genotyp-fenotyp w CD na którą ma wpływ warianty genetyczne *NOD2/CARD15* budzi szczególne zainteresowanie w odniesieniu do lokalizacji choroby Leśniowskiego-Crohna, a także do ciężkości jej przebiegu także u dzieci.(238)

Kliniczna klasyfikacja CD obejmuje podgrupy podzielone ze względu na lokalizację choroby, jej zasięg, przebieg (m. in. tworzenie przetok, obecność zwężeń, aktywność procesów zapalnych) i wywiad chirurgiczny (83). Chorych z CD charakteryzuje zróżnicowanie fenotypowe. Dlatego określenie fenotypu CD niejednokrotnie jest trudne (w grupie NZJ w 10% niemożliwe jest zróżnicowanie CD od UC) (293).

Główną determinantą przebiegu CD jest jej lokalizacja (170). Wydaje się być ona najbardziej stałą cechą dla określenia potencjalnych związków z wariantami genetycznymi *NOD2/CARD15*. Liczne badania analizowały wpływ genotypu *CARD15* na fenotyp CD. Wymienić należy następujące przykładowe prace: Ahmad i wsp. (2) – 244. chorych z CD, Cuthbert i wsp. (47) – 531. chorych z CD, Vermeire i wsp. (297) – 231. chorych z CD, Hampe i wsp. (95) – analiza retrospektywna – 446. chorych z CD, analiza prospektywna – 161 chorych z CD, Lesage i wsp. (164) – 453. chorych z CD (w tym 166. sporadycznych i 287. rodzinnych), Brant i wsp. (29,30) – 275. chorych z CD. Wymienieni autorzy wśród prezentowanych wyników swoich badań stwierdzili, że obecność mutacji *CARD15* (nosicielstwo jednego lub więcej alleli ryzyka *NOD2/CARD15*) ma związek z postacią CD obejmującą jelito cienkie.

Przyczyna związku mutacji *CARD15* z lokalizacją w jelicie cienkim nie jest w pełni wyjaśniona. Lala i wsp. (157) oraz Ogura i wsp. (198) w swoich badaniach wykazali, że *CARD15* ulega silnej ekspresji na komórkach Panetha końcowego odcinka jelita krętego (157,198). Prawdopodobnie częściowy lub całkowity brak funkcji *CARD15* może prowadzić do utraty zdolności komórek Panetha do reagowania na składowe bakterii i w konsekwencji powodować rozwój choroby. Odmienne wyniki prezentowały badania Giachino i wsp. (85), którzy w analizie korelacji mutacja *CARD15*-fenotyp u chorych z CD ujawnili słabszy związek z lokalizacją w jelicie krętym (85).

Wykazywano, że zwłaszcza podwójni nosiciele są rzadko spotykani w CD ograniczonym wyłącznie do okrężnicy (164,297). Hampe i wsp. (96) w badaniu prospektywnym niemieckich i norweskich chorych z CD, wykazali, związek pomiędzy specyficznymi genotypami *CARD15* i obecnością zmian chorobowych w jelicie cienkim i prawej części okrężnicy. Zmiany chorobowe w obrębie jelita cienkiego oraz obecność mutacji

obu alleli *CARD15* wiąże się z wcześniejszym początkiem choroby (2,164). Vermeire i wsp. (297) dokonali oceny częstości wariantów *CARD15* w przypadkach sporadycznych i rodzinnego występowania CD. W analizie wpływu genotypu *CARD15* na fenotyp CD, autorzy ci nie zaobserwowali żadnych różnic (z wyjątkiem wywiadu) pomiędzy badanymi grupami.

Związek alleli ryzyka *NOD2/CARD15* z przebiegiem choroby jest słabiej potwierdzony, co wynika z różnic w klasyfikacji (170). Lesage i wsp. (164), Brant i wsp. (30) i Giachino i wsp. (85) w badaniach chorych z CD wykazali związek między nosicielstwem alleli ryzyka *NOD2/CARD15* i fenotypem „włókniejąco-zwężającym”. Giachino i wsp. (85) w analizie korelacji mutacja-fenotyp ujawnili zwiększone prawdopodobieństwo mutacji w genie *CARD15* u pacjentów z CD z obecnością przetok.

Tomer i wsp. w 2003 roku przedstawili wyniki analizy wariantów genu *NOD2/CARD15* w odniesieniu do fenotypu u 101 dzieci z CD (285). Autorzy przedstawili następujące wnioski: warianty *NOD2/CARD15* są związane z chorobą jelita cienkiego u dzieci, podobnie, jak u dorosłych oraz mają związek z mniejszą masą ciała w momencie diagnozy u dzieci oraz niższą wysokością ciała dzieci z CD. Mechanizm, w wyniku którego dochodzi do opóźnienia wzrastania jest niejasny, najprawdopodobniej wieloczynnikowy. Niewystarczające odżywienie oraz cytokiny stanu zapalnego w jelicie mogą mieć wpływ na ten proces. Zdaniem autorów fakt, że dzieci nosiciele wariantów *NOD2/CARD15* mają znacząco zmniejszoną masę ciała i tendencję do niższej wysokości w momencie rozpoznania choroby może sugerować związek między przebiegiem procesów rozwojowych i *NOD2/CARD15* (285). W badaniach na zwierzętach (szczury z zapaleniem jelita grubego) stwierdzono, że u 40 % badanych, opóźnienie rozwoju (wzrostu) może wynikać z występującego w jelitach stanu zapalnego (14). Jest możliwe, że warianty *NOD2/CARD15* są związane z uwolnieniem cytokin, ciężkim zapaleniem i zaburzeniem rozwoju. Związek opóźnienia wzrastania z *NOD2/CARD15* może być wtórny do powiązań z lokalizacją choroby w jelicie cienkim, co może wpływać na cięższy przebieg choroby (285).

Chorzy z CD klinicznie prezentują różne objawy choroby, w tym. m. in. odmienności w ciężkości przebiegu i lokalizacji. Podatność genetyczna może warunkować fenotyp kliniczny CD. Określenie związku między wariantami *CARD15* i zmiennością fenotypową w obrazie choroby, może nie tylko służyć do oceny klinicznej zmienności w obrazie i przebiegu choroby, lecz także do wyboru racjonalnych strategii leczenia. W przyszłości użycie czynników

genetycznych jako markerów diagnostycznych dla CD będzie szczególnie przydatne, ponieważ klasyfikacja oparta na informacjach genetycznych jest o wiele bardziej stabilna niż objawy i cechy kliniczne, które zależą głównie od czasu trwania choroby i jej aktywności (96,297).

W ostatnim czasie coraz większe znaczenie uzyskują wyniki badań sprzężeń chorób z ich podłożem genetycznym uzyskiwane dzięki metodzie metaanalizy. Tego typu badania były wykonywane u chorych z IBD. Jednak dopiero wyniki metaanalizy opublikowane przez van Heela i wsp. w 2004 roku wniosły nowe spojrzenie na podłoże molekularne IBD (293).

Opierając się częściowo na informacjach wypływających z podanego wyżej przeglądu piśmiennictwa (103,120,122) w odniesieniu do powyżej poczynionych uwag istotnym elementem pracy była ocena częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* w populacji dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Gen ten, znajdujący się na chromosomie 16, zidentyfikowano w 2001 roku. Najlepiej dotychczas przebadane polimorfizmy omawianego genu, to R702W, G908R, c3020insC. Aktualny stan wiedzy wskazuje, iż obecność mutacji wiąże się z większą podatnością na rozwój choroby Leśniowskiego – Crohna, a określone polimorfizmy wydają się wpływać na zróżnicowanie postaci klinicznej choroby. Według reprezentatywnego piśmiennictwa krajowego (151,152) najczęściej w populacji polskiej pojawia się polimorfizm 802C/T, a jego obecność koreluje z pozajelitowymi objawami choroby. Badana grupa dzieci z NZJ nie różni się, pod względem genetycznym, diametralnie od opisywanych grup badanych dorosłych czy dzieci w innych populacji. Obserwowane różnice są statystycznie istotne ale poza podwyższoną częstością c.3020insC w grupie chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelit nie zmieniają dotychczasowego postrzegania udziału wariantów genu *NOD2* w warunkowaniu nieswoistych zapaleń jelit. Poszukiwanie czynników warunkujących występowanie NZJ jest w sferze zainteresowań badaczy zarówno jednostek badawczych jak i klinicznych. Na podstawie dotychczasowej wiedzy można już dziś stwierdzić że trudne będzie wskazanie markera genetycznego, który w sposób jednoznaczny pozwoliłby na wskazanie wysokiego ryzyka występowania nieswoistych zapaleń jelit lub na ich jednoznaczne różnicowanie. Nieswoiste zapalenie jelit jest wypadkową współdziałania wielu czynników środowiskowych i wielu wzajemnie ze sobą oddziałujących czynników dziedzicznych. Pozostaje wciąż otwartym zagadnieniem badawczym mimo angażowania zaawansowanych technologii i bardzo wysokich nakładów finansowych.

W następstwie przeprowadzonych badań genetycznych (zestawienie zbiorcze genotypów uzyskanych w trakcie badań DNA dla grupy dzieci z NZJ zawiera tabela nr 60) na uwagę zasługuje wynik stwierdzający, że w odniesieniu do kontroli, statystycznie istotne różnice w częstości występowania genotypów jak i wariantów polimorficznych zaobserwowano w przypadku c.3020insC w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Związek c.3020insC z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna jest znany od ponad 10 lat (196,197,198). W badanej grupie dzieci częstość allele c.3020insC jest kilkakrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Obserwuje się istotną statystycznie różnicę zarówno w częstości występowania genotypów (Tabela 52) jak i alleli polimorficznych (Tabela 53). Niniejsze obserwacje potwierdzają prace innych autorów, związane z występowaniem wariantu c.3020insC u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (58,107). Na uwagę zasługuje obserwacja podwyższonej częstości występowania wariantu c.3020insC w grupie chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Nie odnotowano związku wariantu c.3020insC z występowaniem colitis ulcerosa w oznaczeniach wykonanych u dorosłych chorych. W badanej grupie dzieci z NZJ zwiększenie opisanej powyżej częstości jest statystycznie istotne, co było już obserwowane podczas badania dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit w Holandii (58). W ramach niniejszej rozprawy zaobserwowano również statystycznie istotną różnicę w częstości występowania polimorfizmu c.2104C>T w grupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Podkreślić należy że takiej obserwacji nie odnotowano w badaniach dzieci z innych populacji (58,107). W przypadku pozostałych dwóch badanych locii polimorficznych c.2722G>C oraz 802C>T nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w porównaniu do częstości występowania tych wariantów w grupie kontrolnej (Tabele 54-59). Analizowana w niniejszym badaniu grupa różni się pod względem częstości występowania wariantów polimorficznych od wyników opublikowanych przez innych autorów. Różnice obserwuje się zarówno w przypadku wariantu c.3020insC jak i c.2104C>T. Może wynikać to między innymi z tego, że badana grupa dzieci nie jest liczna. Analiza statystyczna pozwala jednak na ocenę również mniej licznych grup. Rozbieżności te mogą wynikać także z różnic etnicznych choć omawiane powyżej dane odnosiły się dla populacji zarówno z północy jak i z południa Europy. Nie wykluczone, że do rozwoju choroby wymagane jest odpowiednie zestawienie predyspozycji genetycznych oraz czynników środowiskowych. Różnice w stylu życia oraz nawyków (w tym przypadku np. żywieniowych) mogą jeszcze być na tyle istotne, że do rozwoju choroby w naszej grupie chorych wymagane jest inne tło genetyczne niż w populacjach Europy Zachodniej. Cytowane tu

już obserwacje podwyższonej częstości c.3020insC u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelit zdają się być potwierdzeniem takich przypuszczeń.

Zaprezentowana w rozprawie doktorskiej dyskusja dotycząca etiologii i patomechanizmów odpowiedzialnych za nieswoiste choroby zapalne jelit oraz uzyskane wyniki wykazały, że niezbędne jest opracowanie zarówno nowych metod diagnostycznych, różnicujących postaci kliniczne tych chorób jak i sposobu wczesnego ich wykrywania zwłaszcza w aspekcie konieczności wdrożenia efektywnego leczenia, nakierowanego obecnie na szybkie wygojenie błony śluzowej, zapobieganie powikłaniom (zwężenia, przetoki, ropnie śródbrzusze) i zmniejszenie konieczności wykonywania zabiegów operacyjnych. W wywołaniu procesu chorobowego biorą udział zarówno czynniki środowiskowe, mikrobiologiczne jak i genetyczne pacjenta, co w pewnym zakresie zostało potwierdzone w wynikach rozprawy doktorskiej. Dynamiczny rozwój badań prowadzonych w trójce: genetyka, mikrobiologia, immunologia pozwala żywić nadzieję, że w ciągu najbliższych lat spełnione zostaną nasze oczekiwania i że mimo obniżania się wieku ujawnienia nieswoistych chorób zapalnych jelit, wzrostu zapadalności na te choroby, zmiany obrazu klinicznego (różnice genotypowo-fenotypowe u dzieci i dorosłych) uda się osiągnąć korzystną dla chorych zmianę przebiegu choroby (leczenie biologiczne), poprawę rokowania, a być może nawet pełne wyleczenie.

VI. WNIOSKI

W oparciu o uzyskane wyniki i przeprowadzoną dyskusję wysunięto następujące wnioski:

1. Oznaczanie aktywności M2-PK, oraz stężeń kalprotektyny i laktoferyny w kale jest użytecznym parametrem w monitorowaniu stopnia aktywności nieswoistej choroby zapalnej jelit u dzieci.
2. Najbardziej przydatnym markerem do oceny stopnia aktywności choroby u dzieci z CD okazała się kinaza pirogronianowa guza (M2-PK), zaś u dzieci z CU – laktoferyna.
3. Oznaczanie aktywności M2-PK oraz stężeń kalprotektyny i laktoferyny w kale nie może być zastosowane jako parametr różnicujący pomiędzy CD i CU. Jednoczesowe oznaczanie wymienionych trzech markerów może jednak służyć do różnicowania obu tych chorób (CD i CU) od CI.
4. Aktywność M2-PK oraz stężenia kalprotektyny i laktoferyny dobrze korelują z oznaczanymi we krwi u pacjentów z CD i CU, poziomami tradycyjnych parametrów stanu zapalnego.
5. U dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit obserwuje się występowanie dysbiozy bakteryjnej i grzybiczej przewodu pokarmowego. Obserwowane zmiany są niezależne od wieku dziecka i czasu, który upłynął od postawienia diagnozy NZJ.
6. U dzieci z CD występuje zależność pomiędzy liczebnością wybranych mikroorganizmów w kale, a aktywnością procesu chorobowego, podczas gdy u dzieci z CU takiej korelacji nie stwierdza się. Może to świadczyć o odmiennym podłożu etiologicznym obu jednostek chorobowych.
7. Liczebność wybranych bakterii w kale u dzieci z NZJ przyjętych za tzw. bakterie wskaźnikowe koreluje z aktywnością/stężeniem markerów kałowych. Połączenie obu oznaczeń można zaproponować jako nowy, poszerzony i bardziej przydatny wariant diagnostyki nieinwazyjnej NZJ u dzieci.
8. Częstość występowania wariantów polimorficznych genu *NOD2/CARD15* w badanej grupie dzieci różni się od raportowanej w innych analizowanych populacjach pediatrycznych z NZJ.
9. Częstość występowania wybranych wariantów polimorficznych genu *NOD2/CARD15* w grupie dzieci z CU i CD (lecz nie z CI) jest wyższa aniżeli w grupie kontrolnej.

10. Badanie genetyczne wariantów mutacji genu *NOD2/CARD15* powinno być zalecane na obecnym etapie wiedzy przede wszystkim w szczególnych przypadkach obrazu fenotypowego choroby u dzieci.

VII. Streszczenie

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NZJ) to grupa przewlekłych chorób o nieznannej dotychczas etiologii, dotyczących przewodu pokarmowego. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu patogenezы tych chorób ich etiologia nadal pozostaje niejasna. Najczęściej wyróżnia się dwa podtypy kliniczne: choroba Leśniowskiego-Crohna (CD, ang.: Crohn's disease, Morbus Crohn) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC, ang.: ulcerative colitis). U dzieci często rozpoznawany jest również tzw. colitis indeterminata (zapalenie jelit nieokreślone) z którego rozwinąć może się jeden z dwóch w/w stanów chorobowych. CD i UC mają szeroki zakres manifestacji klinicznych, a ich heterogenność była podkreślana w wynikach badań epidemiologicznych, które koncentrowały się na identyfikacji podgrup lub fenotypów tych jednostek chorobowych.

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost przypadków zachorowań na nieswoiste choroby zapalne jelit, a także obniżanie wieku ich występowania, zwłaszcza wśród ludzi młodych, w tym dzieci. W związku z istniejącym stale problemem dotyczącym możliwie szybkiego, jednoznacznego postawienia prawidłowego rozpoznania różnicowego (choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego czy zapalenie jelita nieokreślone) i powiązanego z nim wdrożenia leczenia kierunkowego, za istotne uznać należy opracowanie nowych, szybkich - wystarczająco dyskryminujących objawy kliniczne (zapalne) mikrobiologiczne i genetyczne, swoiste dla poszczególnych jednostek –nieinwazyjnych testów diagnostycznych.

Biorąc pod uwagę fakt braku odpowiedniej informacji w piśmiennictwie specjalistycznym na powyżej opisane powiązania, a także pragnąc – w oparciu o zaplanowane jednoczesne i kompleksowe badania w trzech obszarach etiopatogenetycznych choroby – postanowiono w rozprawie przeanalizować następujące **cele główne**, których realizacja pomogłaby poprawić diagnostykę, terapię oraz prognozowanie przebiegu nieswoistych chorób zapalnych u dzieci:

- ocenę przydatności jednoczesowego badania wybranych markerów zapalnych: dimerowej formy kinazy pirogronianowej guza (M2-PK), kalprotektyny oraz laktoferyny w kale jako wykładników aktywności procesu chorobowego u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit (NZJ)

- ocenę przydatności markerów zapalnych i zmian liczebności wybranych szczepów bakteryjnych i grzybów w kale u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit w procesie weryfikacji rozpoznania jednej z trzech podstawowych postaci NZJ
- analizę częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* w badanej populacji dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit

W celu realizacji tak zaplanowanych głównych celów pracy uzupełniono je poniżej podanymi **celami szczegółowymi**.

- ocena przydatności oznaczania markerów kałowych jako parametru pozwalającego różnicować postaci kliniczne nieswoistych zapaleń jelit u dzieci tj. chorobę Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita i nieokreślone zapalenie jelit
- ocena zależności pomiędzy poziomem markerów kałowych, a tradycyjnymi parametrami stanu zapalnego, oznaczonymi we krwi
- ilościowa i jakościowa ocena dysbiozy (mikrobiota) w przewodzie pokarmowym u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit
- ocena zależności pomiędzy liczebnością wybranych mikroorganizmów, a poziomem markerów kałowych w poszczególnych postaciach klinicznych i stopniach ciężkości NZJ
- charakterystyka profilu mikrobiota w zależności od wieku dziecka i upływu czasu od postawienia rozpoznania

Do badań zakwalifikowano 108 dzieci hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w okresie od 1 czerwca 2009 do 1 lutego 2011 roku. Wśród pacjentów było 63 chłopców (58,7%) oraz 45 dziewczynek (41,3%), w wieku od 2. r.ż. do 18. r.ż. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (CU) stwierdzono u 37 pacjentów (33 %), a chorobę Leśniowskiego – Crohna (CD) u 47 (44 %). Nieokreślone zapalenie jelita grubego (CI) zdiagnozowano u 25 dzieci (23%). Najliczniej reprezentowana była grupa dzieci w wieku 11 – 15 lat (56,5%).

Rozpoznanie choroby NZJ następowało w oparciu o przyjęte w piśmiennictwie algorytmy postępowania diagnostycznego obejmujące: wywiad lekarski, badanie

przedmiotowe oraz wyniki badań: laboratoryjnych, endoskopowych, radiologicznych i histopatologicznych.

Uzyskane wartości były następnie wykorzystywane dla określenia stopnia aktywności choroby tj. CD, CU i CI i w tym celu zastosowano dwa indeksy: indeks aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wg. Truelova-Wittsa w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego oraz PCDAI (ang.: Paediatric Crohn's disease activity index) – indeks aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego. Arbitralnie przyjęto panel badań laboratoryjnych, który wykonywano u każdego pacjenta. W skład panelu wchodziły: morfologia krwi obwodowej ze wzorem odsetkowym krwinek białych, stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi (CRP), odczyn opadania krwinek czerwonych (OB), stężenie żelaza, stężenie fibrynogenu w osoczu, poziom hemoglobiny we krwi (HGB), liczbę płytek krwi (PLT), poziom białka całkowitego oraz albumin w osoczu krwi oraz stężenie immunoglobuliny IgG w osoczu. Badania endoskopowe przewodu pokarmowego obejmujące: kolonoskopię i gastrokopię przeprowadzono u wszystkich pacjentów. U każdego pacjenta w trakcie badań endoskopowych pobierano wycinki błony śluzowej przewodu pokarmowego celem wykonania badania histopatologicznego. Badanie histopatologiczne umożliwiło ostateczne potwierdzenie wstępnego rozpoznania i zgrupowanie pacjentów w podgrupach z: wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (CU), chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) lub colitis indeterminata (CI). U pacjentów przeprowadzono badania radiologiczne, takie jak: ultrasonografia jamy brzusznej, pasaż przewodu pokarmowego, wlew kontrastowy jelita grubego, enterografia jamy brzusznej (NMR) oraz enterokliza (KT). U 94 pacjentów wykonane zostały dodatkowo badania serologiczne w celu pełniejszego potwierdzenia postawionej diagnozy. Pacjentów zakwalifikowanych do badania zaliczono do jednej z trzech grup, w zależności od czasu, który upłynął od ostatecznego postawienia diagnozy. Miało to na celu ocenę wpływu czasu trwania choroby na poziom markerów zapalnych analizowanych w kale.

U każdego pacjenta wykonano jednocześnie badanie stężenia/aktywności 3 markerów stanu zapalnego jelit w kale: kalprotektyny (FC), laktoferyny (LF) i kinazy pirogronianowej guza (M2-PK). Analiza miała na celu potwierdzenia występowania choroby zapalnej przewodu pokarmowego oraz m.in. ocenę założonej korelacji pomiędzy stopniem aktywności a poziomem markera w kale.

W zakresie badań mikrobiologicznych pobrany od pacjentów kał analizowany był pod kątem występowania i liczebności wybranych bakterii wskaźnikowych. Przyjęta metodyka badania pozwala w sposób ilościowy określić poszczególne rodzaje bakterii znajdujących się w przewodzie pokarmowym człowieka oraz łączną liczbę bakterii. Oznaczane drobnoustroje sklasyfikowano w 3 grupach: bakterie o właściwościach ochronnych, stymulujące układ immunologiczny i bakterie proteolityczne. Pobrany od pacjentów kał analizowany był także pod kątem występowania i liczebności wybranych grzybów drożdżopodobnych.

W zakresie oznaczeń wybranych polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit, badanie wykonano u 82 pacjentów w odniesieniu do grupy kontrolnej. W analizie DNA określono występowanie polimorfizmów: c.3020insC, c.802C>T c.2104C>T, c.2722G>C.

Podsumowanie wyników w zakresie badanych markerów stanu zapalnego u dzieci z NZJ

- Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic wiekowych w grupie badanej.
- Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic w aktywności M2-PK i stężeniu kalprotektyny w kale w zależności od płci.
- Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic w poziomie analizowanych markerów w kale w zależności od wieku.
- Średnie stężenie laktoferyny w kale było istotnie niższe w grupie dziewczynek.
- Poziomy w zakresie normy M2-PK ($\leq 4U/ml$) oraz kalprotektyny (15mg/l) i laktoferyny (7,24 mg/l) obserwowano przede wszystkim u dzieci w łagodnym lub umiarkowanym stadium lub z brakiem aktywności choroby oraz u pacjentów z colitis indeterminata. U pozostałych pacjentów poziom markera był najczęściej wyraźnie podwyższony.
- Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomach wszystkich analizowanych markerów w kale pomiędzy pacjentami z colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna a dziećmi z colitis indeterminata. Brak tej istotności obserwowano pomiędzy colitis ulcerosa i chorobą Leśniowskiego – Crohna.
- Zaobserwowano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kalprotektyny a czasem od postawienia diagnozy. Nie obserwowano podobnej korelacji w przypadku M2-PK oraz laktoferyny.

- Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomami wszystkich badanych markerów w kale a stadium aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego – Crohna oraz colitis ulcerosa u dzieci.
- Najlepszym markerem dla oceny stopnia aktywności choroby Leśniowskiego - Crohna wydaje się być M2PK. Istotną statystycznie różnicę w aktywności markera w kale obserwowano pomiędzy pacjentami z brakiem nasilenia choroby a dziećmi w stanie umiarkowanym i ciężkim choroby, jak również oraz pomiędzy pacjentami w stanie łagodnym a umiarkowanym
- Najlepszym markerem dla oceny stopnia aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wydaje się być laktoferyna. Stężenie markera różni się w sposób istotny statystycznie u pacjentów w łagodnym stadium choroby a dziećmi w stadium umiarkowanym i ciężkim.
- Zaobserwowano istnienie silnej korelacji pomiędzy poziomami oznaczanych markerów w kale. Wzrost stężenia/aktywności jednego z markerów korelował dodatnio ze wzrostem poziomów pozostałych markerów.
- Wykazano istnienie silnej dodatniej korelacji pomiędzy poziomem CRP, OB, fibrynogenu we krwi i liczbą płytek krwi a poziomami wszystkich oznaczanych markerów w kale.
- Silną ujemną zależność zaobserwowano pomiędzy stężeniem/aktywnością poszczególnych markerów, a poziomem hemoglobiny, żelaza we krwi i poziomem albumin w osoczu u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit. Wraz ze wzrostem poziomu tych parametrów, maleje stężenie/aktywność wszystkich trzech oznaczanych markerów. M2-PK i laktoferyna korelują ujemnie ze wskaźnikiem odżywienia Cole'a.
- U pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna wykazano wystąpienie dodatniej korelacji pomiędzy poziomem oznaczanych markerów, a wartością CRP, OB, fibrynogenu i płytek krwi, a ujemnej z poziomem hemoglobiny i albumin w osoczu. M2-PK i laktoferyna korelują ujemnie ze wskaźnikiem odżywienia Cole'a.
- U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy poziomem markerów oznaczanych w kale a wartościami OB i fibrynogenu we krwi, a ujemną - z poziomem hemoglobiny oraz albumin w osoczu.
- U dzieci z colitis indeterminata obserwowano jedynie nieliczne korelacje poziomu markerów w kale z wartościami parametrów stanu zapalnego we krwi.

Podsumowanie wyników w zakresie badań mikrobiologicznych i grzybów

- W kale dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit zaobserwowano zwiększoną liczebność potencjalnie patogennych szczepów *Escherichia coli* (laktozo - ujemnych, śluzowych), bakterii z rodzaju *Proteus*, *Pseudomonas*, bakterii proteolitycznych oraz grzybów drożdżopodobnych.
- W kale dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit zaobserwowano zmniejszoną łączną liczbę bakterii.
- U dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna liczebność drożdżaków przekraczała normę w większym stopniu aniżeli w pozostałych podgrupach pacjentów.
- U dzieci z colitis indeterminata liczebność *Bifidobacterium spp.* mieściła się w zakresie normy, natomiast u pacjentów z colitis ulcerosa oraz chorobą Leśniowskiego – Crohna była obniżona w stosunku do normy fizjologicznej.
- U dzieci z colitis ulcerosa nie wykazano korelacji pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby a liczebnością żadnej z analizowanych grup drobnoustrojów.
- U dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna stopień aktywności choroby istotnie koreluje z łączną liczbą bakterii, liczebnością grzybów drożdżopodobnych oraz bakterii z rodzaju *Clostridium*.
- Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych grup bakterii kałowych (ochronnych, proteolitycznych i immunostymulujących) w zależności od stadium aktywności klinicznej choroby u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit.
- Wykazano wyraźną, ujemną korelację pomiędzy stopniem aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego – Crohna, a liczebnością bakterii o właściwościach ochronnych. Im mniejsza jest liczebność mikroflory ochronnej tym większe wydaje się być zaostrzenie zmian zapalnych. U pacjentów z colitis ulcerosa obserwuje się podobną tendencję zmian.
- Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy wiekiem badanych dzieci oraz czasem od postawienia diagnozy a liczebnością ocenianych mikroorganizmów.
- Wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy:
 - poziomem wszystkich analizowanych markerów kałowych a liczebnością *Bacteroides spp.*

- liczebnością grupy bakterii ochronnych i *Bacteroides spp.* a aktywnością M2 – PK i stężeniem laktoferyny w kale
- aktywnością M2-PK a liczebnością *Bifidobacterium spp.*
- Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy
- poziomem grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* a aktywnością M2-PK i laktoferyny w kale
- poziomem bakterii proteolitycznych a aktywnością M2-PK i stężeniem laktoferyny w kale

Podsumowanie wyników w zakresie oznaczeń wybranych mutacji i polimorfizmów genu *NOD2/CARD15*:

- Obserwowano statystycznie istotną różnicę w częstości występowania genotypów oraz alleli u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku polimorfizmów c.3020insC oraz 2104C>T.
- Obserwowano statystycznie istotną różnicę w częstości występowania genotypów oraz alleli u chorych z CU w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku polimorfizmu c.3020insC
- Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania badanych alleli w grupie chorych z nieokreśloną postacią nieswoistego zapalenia jelit w porównaniu z grupą kontrolną
- Zaobserwowano różnicę częstości w występowaniu alleli i genotypów polimorfizmu 802C/T u chorych z CD a grupą chorych z CU.

W oparciu o uzyskane wyniki i przeprowadzoną dyskusję wysunięto następujące wnioski:

1. Oznaczanie aktywności M2-PK, oraz stężeń kalprotektyny i laktoferyny w kale jest użytecznym parametrem w monitorowaniu stopnia aktywności nieswoistej choroby zapalnej jelit u dzieci.
2. Najbardziej przydatnym markerem do oceny stopnia aktywności choroby u dzieci z CD okazała się kinaza pirogronianowa guza (M2-PK), zaś u dzieci z CU – laktoferyna.

3. Oznaczanie aktywności M2-PK oraz stężeń kalprotektyny i laktoferyny w kale nie może być zastosowane jako parametr różnicujący pomiędzy CD i CU. Jednoczesowe oznaczanie wymienionych trzech markerów może jednak służyć do różnicowania obu tych chorób (CD i CU) od CI.
4. Aktywność M2-PK oraz stężenia kalprotektyny i laktoferyny dobrze korelują z oznaczanymi we krwi u pacjentów z CD i CU, poziomami tradycyjnych parametrów stanu zapalnego.
5. U dzieci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit obserwuje się występowanie dysbiozy bakteryjnej i grzybiczej przewodu pokarmowego. Obserwowane zmiany są niezależne od wieku dziecka i czasu, który upłynął od postawienia diagnozy NZJ.
6. U dzieci z CD występuje zależność pomiędzy liczebnością wybranych mikroorganizmów w kale, a aktywnością procesu chorobowego, podczas gdy u dzieci z CU takiej korelacji nie stwierdza się. Może to świadczyć o odmiennym podłożu etiologicznym obu jednostek chorobowych.
7. Liczebność wybranych bakterii w kale u dzieci z NZJ przyjętych za tzw. bakterie wskaźnikowe koreluje z aktywnością/stężeniem markerów kałowych. Połączenie obu oznaczeń można zaproponować jako nowy, poszerzony i bardziej przydatny wariant diagnostyki nieinwazyjnej NZJ u dzieci.
8. Częstość występowania wariantów polimorficznych genu *NOD2/CARD15* w badanej grupie dzieci różni się od raportowanej w innych analizowanych populacjach pediatrycznych z NZJ
9. Częstość występowania wybranych wariantów polimorficznych genu *NOD2/CARD15* w grupie dzieci z CU i CD (lecz nie z CI) jest wyższa aniżeli w grupie kontrolnej
10. Badanie genetyczne wariantów mutacji genu *NOD2/CARD15* powinno być zalecane na obecnym etapie wiedzy przede wszystkim w szczególnych przypadkach obrazu fenotypowego choroby u dzieci.

VIII. Summary

Diagnostic and prognostic evaluation of selected inflammatory markers, microflora and genetic predisposition in inflammatory bowel disease in pediatric patients.

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic diseases, whose etiology is yet unknown, affecting digestive tract. Chronic inflammation of the digestive tract is the main feature of this group. Although there has been significant progress in understanding the pathogenesis of these diseases, their etiology still remains unclear.

The two most commonly distinguished clinical subtypes are Crohn's disease (CD, Morbus Crohn) and ulcerative colitis (UC). In children, the diagnosis of colitis indeterminate colitis is often made, which can later develop into one of the two previously mentioned diseases. CD and UC have a wide range of clinical manifestations and their heterogeneity was emphasized in results of epidemiological researches which concentrated on the identification of subgroups or phenotypes of these disease entities.

It was noted that in recent years there has been a marked rise in the incidence of inflammatory bowel diseases as well as a considerable decrease in the age at its diagnosis especially among young people and children. As a possibly quick and unequivocal differential diagnosis between Leśniowski-Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis (which is necessary to start prompt targeted treatment) is still problematic, it is important to develop a new and quick non-invasive diagnostic tests that would and sufficiently determine clinical (inflammatory), microbiological and genetic symptoms and signs specific for each entity.

Taking into account the fact that in specialist literature there is no required information on the above described diagnostic problem and also based on planned simultaneous and complex investigations of three etiopathogenetic areas of the disease – it was decided that the paper would analyze the following main objectives, whose achievement could improve diagnostic process, therapy and prognosis in the course of inflammatory bowel diseases in children:

- Assessing the usefulness of selected inflammatory markers' simultaneous investigation: the dimeric form of tumor pyruvate kinase (M2-PK), calprotectin and

lactoferrin in stool as disease activity parameter in children with inflammatory bowel diseases (IBD).

- Assessing the usefulness of inflammatory markers and changes in number of bacterial and fungal strains in stool of children with inflammatory bowel diseases in the process of verification of differential diagnosis between three basic IBD forms.
- Analysing the prevalence of selected gene *NOD2/CARD15* polymorphism in investigated population of children with inflammatory bowel diseases.

To achieve the planned main objectives of this paper, the following detailed objectives have been added.

- Assessing the usefulness of a fecal markers assay as a parameter allowing differentiation between clinical forms of inflammatory bowel diseases in children, that is Leśniowski – Crohn’s disease, ulcerative colitis and indeterminate colitis.
- Assessing the correlation between levels of fecal markers and traditional inflammatory markers assays in blood.
- Quantitative and qualitative assessment of dysbiosis (microbiota) in gastrointestinal tracts in children with inflammatory bowel diseases.
- Assessing the correlation between a population of selected microorganisms and concentration of fecal markers in each clinical form and severity of IBD.
- Characteristics of the microbiota profile depending on a child’s age and time that has elapsed since the diagnosis.

All 108 children enrolled in the study were hospitalised in the Paediatric Gastroenterology and Metabolic Diseases Clinic of Karol Marcinkowski Medical University in Poznań over a period from 01 June 2009 to 1 February 2011. Among patients there were 63 boys (58,7%) and 45 girls (41,3%). All children enrolled to the study were diagnosed with inflammatory bowel diseases. Ulcerative colitis (UC) was diagnosed in 37 patients (33%) and Leśniowski-Crohn’s disease (CD) in 47 (44%). Indeterminate colitis (IC) was diagnosed in 25 children (23%). The majority of cases (56.5%) were encountered in children aged 11-15 years.

The diagnosis of IBD was based on diagnostic pathways accepted in literature, including history, examination as well as laboratory, endoscopic radiologic and histopathology investigations results.

Obtained values were used to determine the disease (CD, UC and IC) activity level. For this purpose, two indexes were used: Truelov and Witts classification of severity of ulcerative colitis with Ryzka and Woynarowski modification and PCDAI – Paediatric Crohn’s disease activity index with Ryzka and Woynarowski modification. The set of laboratory investigations which was requested for every patient was agreed arbitrarily. It included the following tests: full blood count with differential, serum CRP level, erythrocyte sedimentation rate (ESR), iron , fibrinogen in serum, hemoglobin (HGB), platelets (PLT), total protein and albumin in serum and IgG. Endoscopic investigations of gastrointestinal tract including colonoscopy, and gastroscopy were performed in all enrolled patients. During endoscopic examinations, mucosal samples were taken from all patients and sent for histopathology investigations.

Histopathology investigation allowed final confirmation of initial diagnosis and classification of patients into one of subgroups: with ulcerative colitis (UC), Leśniowski-Crohn’s disease (CD) or indeterminate colitis (IC).

In analyzed patients, radiologic investigations such as abdominal ultrasound, digestive tract transit time, barium enema, MRI enterography and CT enteroclysis were conducted. In 94 patients, additional serological investigations were conducted to additionally ascertain the final diagnosis of UC or CD. For this purpose, anti-neutrophilic cytoplasmic antibody (ANCA) and *anti-Saccharomyces cerevisiae* antibody titers were investigated.

Patients enrolled in this study were divided into three groups depending on the time which has elapsed since the final diagnosis. The aim was to assess the influence of illness duration on fecal inflammatory markers levels.

Every patient had 3 bowel inflammatory markers levels measured in stool simultaneously: fecal calprotectin (FC), lactoferrin (LF) and tumor pyruvate kinase (M2-PK). The analysis aimed at confirming the diagnosis of inflammatory disease of gastrointestinal tract and assessing complex correlation between disease activity and marker level in stool.

Fecal samples obtained from patients underwent microbiological assessment to determine the presence and quantity of selected indicative bacteria. Applied study methodology allows quantitative assessment of individual types of bacteria present in human gastrointestinal tract and total number of bacteria. Assessed microorganisms were classified into 3 groups: bacteria with protective properties, bacteria stimulating the immunological system and proteolytic bacteria.

Fecal samples obtained from patients were analyzed for presence and quantity of selected fungi. Performed investigations allow quantitative determination of types of yeast-like present in human gastrointestinal tract based on stool investigation.

To determine the selected *NOD2/CARD15* gene polymorphism and mutations in patients with inflammatory bowel disease, a molecular analysis of the deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from nucleated cells of blood samples collected from 82 patients enrolled to this study was conducted, according to control group. The DNA analysis determined the presence of the following polymorphism: c.3020insC, c.802C>T, c.2104C>T, c.2722G>C in the investigated group of patients.

Summary of investigated inflammatory bowel markers results in children with IBD:

- there was no statistically significant difference in the age in the investigated group;
- there were no statistically significant differences in M2-PK and calprotectin levels between men and women;
- there were no statistically significant differences in analyzed markers levels between different age groups;
- the mean lactoferrin level in stool was significantly higher in girls;
- physiological levels of M2-PK ($\leq 4U/ml$), calprotectin (15mg/l) and lactoferrin (7.24 mg/l) were noted mainly in children with mild and moderate stage or when disease was inactive as well as in patients with indeterminate colitis. In remaining patients the marker level was usually significantly elevated;
- there was a statistically significant difference demonstrated in all analyzed markers concentrations in stool between group of patients with ulcerative colitis or Leśniowski-Crohn's disease and children with indeterminate colitis. There was no significant

difference in the stool marker concentration between patients with ulcerative colitis and Leśniowski –Crohn’s disease;

- there was a statistically significant, positive correlation noted between calprotectin concentration and the time that has elapsed since the diagnosis. There was no such correlation for M2-PK and lactoferrin;
- a statistically significant correlation between concentration of all investigated fecal markers and clinical activity of Leśniowski-Crohn’s disease and ulcerative colitis was demonstrated in children;
- M2-PK seems to be the best marker of Leśniowski-Crohn’s disease activity. A statistically significant difference in the marker level in stool was observed between patients with severe, moderate and inactive disease as well as between patients with mild and moderate disease;
- the best marker of ulcerative colitis activity seems to be lactoferrin. The difference in marker levels between patients with mild and moderate or severe disease activity is statistically significant;
- a strong correlation was noted between levels of investigated fecal markers. The rise in the level of one marker was positively correlated with the rise in levels of other markers;
- a strong positive correlation of CRP, ESR, blood’s fibrinogen and platelets number with concentration of all investigated fecal markers was demonstrated;
- there was a strong negative correlation of concentrations of individual markers with levels of hemoglobin, iron in blood and serum albumin in patients with inflammatory bowel disease. Along with the rise in those parameters, the concentration of all three investigated markers decreases. M2-PK and lactoferrin is negatively correlated with Cole nutritional index;
- in patients with Leśniowski-Crohn’s disease, a positive correlation of levels of CRP, ESR, fibrinogen and platelets with investigated markers was demonstrated, while hemoglobin and serum albumin levels showed negative correlation with those markers. M2-PK and lactoferrin are negatively correlated with Cole nutritional index;

- in children with ulcerative colitis, levels of fecal markers correlated positively with ESR and blood fibrinogen whereas with hemoglobin and serum albumin they correlated negatively;
- in children with indeterminate colitis, only in few cases was the correlation between fecal markers levels and blood inflammatory markers observed.

Summary of microbiology and mycology results:

- it was noted that in the faeces from children with inflammatory bowel disease, there was an increased number of potentially pathogenic strains of *Escherichia coli* (lactose – negative, mucous), *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, proteolytic bacteria and yeast-like fungi;
- it was noted that in the stool collected from children with inflammatory bowel disease there was a reduced total number of bacteria;
- in children with Crohn's disease the number of yeast-like fungi exceeded the physiological norm to a greater extent than in other subgroups of patients;
- in children with indeterminate colitis, the number of *Bifidobacterium spp.* was within accepted physiological range, whereas in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, it was below normal range;
- in children with ulcerative colitis, there was no correlation between a clinical disease activity and the number of analyzed groups of microorganisms;
- in children with Crohn's disease, the disease activity level correlates significantly with the number of yeast-like fungi and *Clostridium spp.*;
- in children with inflammatory bowel disease, there was no statistically significant difference in population of fecal bacteria from various groups (protective, proteolytic and immunostimulating) in relation to clinical disease activity;
- the strong negative correlation between clinical activity of Crohn's disease and population of protective bacteria was demonstrated. The smaller number of protective microbiota the greater seems to be an exacerbation of inflammatory changes. In patients with ulcerative colitis the similar tendency was observed;

- children's age and the time that has elapsed since diagnosis did not show statistically significant correlation with the number of analyzed microorganisms.

There was a statistically significant negative correlation of:

- a level of all analyzed fecal markers and the number of *Bacteroides spp.*;
- the population of protective bacteria and *Bacteroides spp.* with M2-PK and lactoferrin;
- activity of M2-PK the and number of *Bifidobacterium spp.*

There was a statistically significant positive correlation between:

- the number of yeast-like fungi of *Candida* genus and activity of M2-PK as well as concentration of lactoferrin;
- the number of proteolytic bacteria and M2-PK activity as well as concentration of lactoferrin.

Summary of *NOD2/CARD15* genes polymorphism and mutations investigation results:

- for c3020insC and 2104C>T polymorphism, there was a statistically significant difference in the prevalence of genotypes and alleles between patients with Leśniowski-Crohn's disease and a control group;
- for c.3020insC polymorphism, there was a statistically significant difference in the prevalence of genotypes and alleles between patients with UC and control group;
- no statistically significant difference in the prevalence of investigated alleles between patients with indeterminate colitis and control group was observed;
- it was noted that there was a difference in the prevalence of alleles and genotypes of 802C/T polymorphism between patients with CD and UC.

Based on obtained findings and a discussion, the following conclusions were drawn:

1. determination of M2-PK, calprotectin and lactoferrin level in stool is a useful parameter in monitoring disease activity in children with inflammatory bowel disease;

2. tumor pyruvate kinase (M2-PK) was found to be the most useful parameter to monitor disease activity in children with CD, whereas in children with UC such parameter was a lactoferrin;
3. determination of M2-PK, calprotectin and lactoferrin levels in stool cannot be used as a parameter differentiating between CD and UC. Simultaneous determination of all three mentioned markers can however be used to distinguish both CD and UC from IC;
4. concentrations of M2-PK, calprotectin and lactoferrin show a good correlation with traditional inflammatory markers measured in blood of patients with CD and UC;
5. in children with inflammatory bowel disease, there is a bacterial and fungal dysbiosis in the gastrointestinal tract. Observed changes are independent from child's age and the time that has elapsed since the diagnosis;
6. in children with CD there is a correlation between population of selected fecal microorganisms and disease activity, whereas in children with UC such correlation has not been shown. This may be an evidence of a different etiological background of those diseases;
7. population of selected fecal bacteria considered to be so called indicator bacteria in children with inflammatory bowel diseases correlates with concentration of fecal markers. Combination of those two tests could be suggested as a new, broader and more useful option of noninvasive IBD diagnostics in children;
8. the frequency of polymorphic variants of the *NOD 2* gene in the analyzed group of children differs from that of reported in other pediatric populations with IBD;
9. the frequency of selected polymorphic variants of the *NOD 2* gene in children with CU and CD, but not with the CI, is higher than in the control group;
10. at the present stage of knowledge, the genetic analysis of variants of *NOD2* gene mutations, should be recommended in exceptional cases of phenotype image of the disease in children.

IX. Piśmiennictwo:

1. Aadland E., Fagerhol M: Fecal Calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2002,14:823-23
2. Ahmad T., Armuzzi A., Bunce M. i wsp.: The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterol.* 2002, 122: 854-866.
3. Amre D. K., Seidman E. G.: DNA variants in cytokine and *NOD2* genes, exposures to infections and risk for Crohn's disease. *Paediatr. Perinatal. Epid.* 2003, 17: 302-312.
4. Amre D. K., Seidman E. G.: Etiopathogenesis of pediatric Crohn's disease. Biologic pathways based on interactions between genetic and environmental factors. *Med. Hypothesis.* 2003, 60: 344-350.
5. Andoh A., Fujiyama J.: Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006,12:4452-4460
6. Andres P. G., Friedman L. S.: Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clinic. North Am.* 1999, 25: 255-281.
7. Andus T., Gross V.: Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease environmental factors. *Hepatology* 2000; 47:29-43.
8. Aomatsu T., Yoden A., Matsumoto K.: Fecal calprotectin is a useful for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2011,56:2372-2377. doi 10.107/s10620-011-1633-y.
9. Armitage E., Drummond H., Ghosh S. i wsp.: Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland. *Lancet* 1999, 353: 1496-1497.
10. Armuzzi A., Ahmad T., Ling K. L. i wsp.: Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut.* 2003, 52: 1133-1139.
11. Atreya R., Mudter J., Finotto S. i wsp.: Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 2000, 6(5): 583-588.
12. Austin G.L., Herfarth H. H, Sandler R. S.: A Critical Evaluation of Serologic Markers for Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007; 5: 545-547
13. Ayling RM.: New faecal tests in gastroenterology. *Ann Clin Biochem* 2012,49(1):44-54.

14. Ballinger A. B., Azooz O., El Haj T. i wsp.: Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. *Gut*. 2000, 46: 694-700.
15. Banaszkiwicz A., Albrecht P., Radzikowski A.: Szczepienia w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(2):111-114.
16. Baron S., Turck D., Leplat C. i wsp.: Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut*. 2005, 54(3): 357-363.
17. Bednarz W., Olewiński R., Głód M. i wsp.: Leczenie chirurgiczne choroby Leśniowskiego-Crohna. *Gastroenterol. Pol.* 2010,17(4):261-268.
18. Benchimol EI., Fortinsky KJ., Guzdra P. i wsp.: Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis* 2011,17(1):429-439.
19. Bernstein C. N., Blanchard J. F., Rawsthorne P. i wsp.: Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am. J. Epidemiol.* 1999, 149: 916–924.
20. Bertin J., Nir W. J., Fischer C. M. i wsp.: Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 1999, 19(274): 12955-12958.
21. Binder V.: Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 1998, 16: 351–355.
22. Bischoff S. C., Schwengberg S., Lorentz A. i wsp.: Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells. *Neurogastroenterol. Motil.* 2004, 16(2): 185-193.
23. Boirivant M., Cossu A.: Inflammatory bowel disease. *Oral Diseases* 2012,18(1)1-15
24. Bonen D. K., Cho J. H.: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2003, 124(2): 521-536.
25. Bonen D. K., Nicolae D. L., Moran T. i wsp.: Racial differences in *NOD2* variation: characterization of *NOD2* in African-Americans with Crohn's disease (abstr). *Gastroenterol.* 2002, 122(Suppl): A-29.
26. Bonen D. K., Ogura Y., Nicolae D. L. i wsp.: Crohn's disease-associated *NOD2* variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterol.* 2003, 124: 140–147.

27. Borkowska A., Liberek A., Plata-Nazar K. i wsp.: Utility of fecal marker of inflammation in the diagnostics of inflammatory bowel diseases. *Med Wieku Rozwoj.* 2010,14(1):37-41.
28. Borkowska A.: Laktoferyna w kale jako wykładnik aktywności procesu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk, 2008.
29. Brant S. R., Panhuysen C. I., Nicolae D. i wsp.: MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 73(6): 1282-1292.
30. Brant S. R., Picco M. E., Achkar J. P. i wsp.: Defining complex contributions of *NOD2/CARD15* gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2003, 9(5): 281-289.
31. Bremner A, Roked S, Robinson R, i wsp.: Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr.* 2005,94(12):1855-8,
32. Buisson A., Chevaux JB., Bommelaer G. i wsp.: Diagnosis, prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence. *Digestive and Liver Disease.* 2012, doi:10.1016/j.dld.2011.12.018
33. Bukowska-Posadzy A.: Identyfikacja, diagnoza i wstępna konceptualizacja psychologicznego programu profilaktyki dla dzieci chorujących na nieswoiste zapalenie jelit. Rozprawa doktorska UMP Poznań. 2010
34. Bunn SK., Bissel WM., Main MJ i wsp.: Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001,33(1):14-22.
35. Burstein H. J., Shea C. M., Abbas A. K.: Aqueous antigens induce in vivo tolerance selectively in IL-2 and IFN-gamma-producing (Th1) cells. *J. Immunol.* 1992, 148: 3687-3691.
36. Calkins B. M.: A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 1989, 34: 1841–1854.
37. Cavanaugh J.: International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 68: 1165–1171.

38. Celińska-Cedro D., Wardak K., Ryzko J.: Przejście młodocianych chorych z nieswoistym zapaleniem jelit do systemu opieki zdrowotnej dla dorosłych. *Pediatrica Współczesna* 2011,13(1)61-64
39. Chamaillard M., Philpott D., Girardin S. E. i wsp.: Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2003, 100: 3455-3460.
40. Chen W., Li D., Paulus B. i wsp.: Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15(10): 1145-1150.
41. Christofk H.R., Heiden M.G., Harris M.H. i wsp.: Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature Articles* 2008, 452:181-188.
42. Chung-Faye G., Hayee B.H., Maestranzi S. i wsp.: Fecal M2-Pyruvate Kinase (M2-PK): A Novel Marker of Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2007, 13(11): 1374 – 1378
43. Corrao G., Tragnone A., Caprilli R. i wsp.: Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Internat. J.Epid.* 1998, 27: 397-404.
44. Costa F., Mumolo MG., Ceccarelli L. i wsp.: Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005,54:364-368. doi: 10.1136/gut.2004.043406
45. Crchton D.N., Arnott I.D.R., Watts D. I. i wsp.: *NOD2/CARD15* mutations in a Scottish Crohn's Disease population. *Gastroenterology* 2002, 122, M1420
46. Croucher P. J. P., Mascheretti S., Hampe J. i wsp.: Haplotype structure and association to Crohn's disease of *CARD15* mutations in two ethnically divergent populations. *Europ. J. Hum. Genet.* 2003, 11: 6-16.
47. Cuthbert A. P., Fisher S. A. Mirza M. M. i wsp.: The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2002, 122: 867-874.
48. Czkwianians E., Kolasa-Kicińska M., Trojanowska-Lipczyk J. i wsp.: Analiza częstości występowania, przebiegu klinicznego oraz terapii choroby Leśniowskiego-Crohna u dzieci. *Pol.Merk. Lek.* 2009,155(26):446:451.

49. Czub E, Herzig KH, Szaflarska-Popławska A, i wsp.: Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2007,42(10):1147-50.
50. D'Haens G., Geboes K., Peeters M., i wsp.: Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterol.* 1998, 114: 262 - 267
51. D'Inca R., Dal Pont E., Di Leo V. i wsp.: Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int. J. Colorectal. Dis.* 2007, 22: 429-437.
52. D'Inca R., Dal Pont E., Di Leo V., i wsp.: Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease?. *Am J Gastroenterol* 2008,103(8):2007-2014.
53. Dai C., Zhao DH.,Jiang M.: VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine* 2012,29(2):202-208.
54. Danes S., Sans M., Fiocchi C.: Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun. Rev.* 2004, 3(5): 394-400.
55. de Bie Cl., Buderus S., Sandhu BK. i wsp.: Diagnostic workup of paediatric patients with inflammatory bowel disease in Europe: results of a 5-year audit of the EUROKIDS Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012,54(3):374-380.
56. de Jong NS, Leach ST, Day AS.: Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006,12(7):566-72.
57. de Mesquita M.B., Civitelli F., Levine A.: Epidemiology, genes and inflammatory bowel diseases in childhood. *Dig. Liver Dis.*, 2008, 4: 3-11
58. de Ridder, L., R. K. Weersma, et al. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007, 13(9): 1083-1092
59. Delmulle L.: *Lactobacilli, bifidobacteria* and fibres. Compilation of available literature on *Lactobacillus* and Oligosaccharides. *Beneflora.* 2002
60. Dixon M. S., Golstein C., Thomas C. M. i wsp.: Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 16(97): 8807-8814.
61. Dobrowolska-Zachwieja A., Kaczmarek M., Hoppe-Gołębiowska J, i wsp.: Wpływ wariantu mutacji *NOD2/CARD15* na występowanie objawów spoza przewodu

- pokarmowego u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w populacji polskiej. Now. Lek. 2004, 73: 337-348
62. Dobrowolska-Zachwieja A., Kaczmarek M., Hoppe-Gołębiewska J. i wsp.: The sequence variant of *NOD2/CARD15* in a Polish family on the background of Polish patients with Crohn's disease. Gastroenterol. Pol. 2004, 11(4): 325-331.
 63. Dobrowolska-Zachwieja A.: Ocena przydatności diagnostycznej, prognostycznej i terapeutycznej oznaczeń wybranych mutacji i polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Rozprawa habilitacyjna. AM Poznań 2005.
 64. Duerr R. H., Barmada M. M., Hang L. i wsp.: Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. Hum. Mol. Genet. 2002, 11(21): 2599-2606.
 65. Duerr R. H., Barmada M. M., Zhang L. i wsp.: High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. Am. J. Hum. Genet. 2000, 66: 1857-1862.
 66. Duggan A. E., Usmani I., Neal K. R. i wsp.: Appendectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case-control study. Gut 1998, 43: 494-498.
 67. Ehrentraut SF., Colgan SP.: Implications of protein posttranslational modifications in IBD. Inflamm Bowel Dis 2012 – w druku
 68. Ekbom A., Adami H. O., Helmick C. G. i wsp.: Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. Am. J. Epid. 1990, 132: 1111-1119.
 69. Ekbom A., Daszak P., Kraaz W. i wsp. Crohn's disease after in utero measles virus exposure. Lancet 1996, 348: 515-517.
 70. Ekbom A., Wakefield A. J., Zack M. i wsp.: Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. Lancet 1994, 344: 508-510.
 71. Ekbom A., Zack M., Adami H. O. i wsp.: Is there clustering of inflammatory bowel disease at birth? Am. J. Epid. 1991, 134: 876-886.
 72. Elliott D. E., Urban J. F., Argo C. K. i wsp.: Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? FASEB Journal. 2000, 14: 1848-1855.
 73. Ewaschuk J., Dieleman L.: Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2006, 7: 5941-5950

74. Fagerberg UL., Loos L., Myrdal U. i wsp.: Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005,40(4):450-455.
75. Farmer R. G., Michener W. M., Mortimer E. A.: Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 1980, 9: 271–277.
76. Fava F, Danese S.: Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol*. 2011,17(5):557-66.
77. Fiocchi C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol*. 1998, 115:182-205.
78. Fisher S. A., Hampe J., Macpherson A. J. i wsp.: Sex stratification of an inflammatory bowel disease genome search shows male-specific linkage to the HLA region of chromosome 6. *Eur. J. Hum. Genet*. 2002, 10: 259–265.
79. Foell D., Witkowski H., Roth J.: Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*. 2009,58(6):859-868.
80. Forbes GM.: Review: Fecal calprotectin is accurate for screening for suspected IBD in adults but less so in children. *Ann Intern Med*. 2011,154(2):JC1-12.
81. Friedrich C., Fajfar A., Pawlik m. i wsp.: Magnetic resonance enterography with and without biphasic contrast agent enema compared to conventional ileocolonoscopy in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012 - w druku
82. Fuss I. J., Neurath M., Boirivant M. i wsp.: Disparate CD4+lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol*. 1996, 157(3): 1261-1270.
83. Gasche C., Scholmerich J., Brynskov J. i wsp.: A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000, 6: 8–15.
84. Gent A. E., Hellier M. D., Grace R. H. i wsp.: Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994, 343: 766-767.
85. Giachino D., van Duist M. M., Regazzoni S. i wsp.: Analysis of the *CARD15* variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Europ. J. Hum. Genet*. 2004, 12: 206-212.

86. Gibson GR, Roberfroid MB.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995,125(6):1401-12.
87. Gilat T., Hacoheh D., Lilos P. i wsp.: Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand. J. Gastroenterol.* 1987, 22: 1009-1024.
88. Gisbert JP., Bermejo F., Perez-Calle JL i wsp.: Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm Bowel Dis* 2009,15(8):1190-1198.
89. Gisbert JP., McNicholl AG., Gomollon F.: Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009,15(11):1746-1754.
90. Gosiewski T., Strus M., Fyderek K. i wsp.: Horizontal distribution of the fecal microbiota in adolescents with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2012,54(1):20-27
91. Grimes D. S.: *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Gut* 2003, 52(1): 155.
92. Groux H., O'Garra A., Bigler M. i wsp.: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell response and prevents colitis. *Nature.* 1997, 389: 737-742.
93. Guariso G., Gasparetto M., Visona Dalla Pozza L. i wsp.: Inflammatory bowel disease developing in paediatric and adult age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010,51(6):698-707.
94. Hampe J., Cuthbert A., Croucher P. J. P. i wsp.: Association between insertion mutation in *NOD2* gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001, 357: 1925-1928. Erratum: *Lancet.* 2002, 360: 806.
95. Hampe J., Cuthbert A., Croucher P.J. i wsp.: Association between insertion mutation in *NOD2* gen and Crohn`s disease in German and British populations. *Lancet* 2001, 356: 1925-1928
96. Hampe J., Grebe J., Nikolaus S. i wsp.: Association of *NOD2 (CARD15)* genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet.* 2002, 359(9318): 1661-1665.
97. Hampe J., Lynch N. J., Daniels S. i wsp.: Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2001, 48(2): 191-197.

98. Hampe J., Schreiber S., Shaw S. H. i wsp.: A genome-wide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64(3): 808-816.
99. Hardt PD, Mazurek S, Toepler M.: Faecal tumor M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2004, 91:980–984
100. Haslam N., Mayberry J. F., Hawthorne A. B. i wsp.: Measles, month of birth, and Crohn's disease. *Gut* 2000, 47: 801-803.
101. Haug U, Rothenbacher D, Wentz M.N. i wsp.: Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2007, 96:1329-1334
102. Henderson P., Casey A., Lawrence SJ i wsp.: The diagnostics of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2012. doi:10.1038/ajg.2012.33 (Epub ahead of print)
103. Henderson P., Wilson DC., Satsangi J.: Differences in phenotype and disease course in adult and paediatric inflammatory bowel disease: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 2012,35(30):391-392.
104. Hendrickson B. A., Gokhale R., Cho J. H.: Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15: 79-94.
105. Heyman MB, Kirschner BS, Gold BD. i wsp.: Children with early-onset inflammatory bowel disease (IBD): analysis of a pediatric IBD consortium registry. *J Pediatr.* 2005,146(1):35-40.
106. Hildebrand H., Finkel Y., Grahnquist L. i wsp.: Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut* 2003, 52(10): 1432-1434.
107. Hsiao, C. H., S. C. Wei, et al. Pediatric Crohn disease: clinical and genetic characteristics in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007,44(3): 342-346
108. Hsieh C. S., Heimberger A. B., Gold J. S. i wsp.: Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in alpha beta T-cell receptor transgenic system. *Proc. Nat. Acad. Scienc. U.S.A.* 1992, 89(13): 6065-6069.
109. Hugot J. P., Alberti C., Berrebi D. i wsp.: Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003, 362(9400): 2012-2015.
110. Hugot J. P., Chamaillard M., Zouali H. i wsp.: Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411: 599-603.

111. Hugot J. P., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C. i wsp.: Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996, 379: 821–823.
112. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, i wsp.: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through *NOD2*. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003, 278 :5509–5512.
113. Inohara N., Koseki T., del-Peso L. i wsp.: *NOD1*, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem*. 1999, 274(27): 14560-14567.
114. Inohara N., Ogura Y., Chen F. F. i wsp.: Human *NOD1* confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem*. 2001, 276: 2551–2554.
115. Inoue N., Tamura K., Kinouchi Y. i wsp.: Lack of common *NOD2* variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterol*. 2002, 123: 86–91.
116. Irwine E. J., Forrokhlyar F., Swarbrick E. T. i wsp.: A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol*. 2001, 36, 2-15.
117. Iwańczak B., Iwańczak F.: Klasyfikacje dotyczące lokalizacji i aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2011,4(13):246-251
118. Iwańczak B., Iwańczak F.: Leczenie ciężkiego ostrego rzutu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(3):175-180.
119. Iwańczak B., Iwańczak F.: Zmienność epidemiologiczna i kliniczna zapaleń jelit u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2009,11(2):63-66
120. Jacobsen C., Bartek Jr., Wewer V. i wsp.: Differences in phenotype and disease course in adult and paediatric inflammatory bowel disease-a population-based study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2011,34(10):1217-1224.
121. James S. P.: Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2005, 115(1): 25-30.
122. Jańczyk W.: Postępowanie w ciężkim zaostrzeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. *Standardy Medyczne/Pediatrics* 2011,8(682-686).
123. Janowitz H. D.: Burrill B. Crohn (1884-1983). *Mt. Sinai J. Med*. 2000, 67(1): 12-13.
124. Jayanthi V., Robert C. S. J., Pinder D. i wsp. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Quart. J. Med*. 1992, 82: 125-138.

125. Jeffery J., Lewis S.J., Ayling R.M.: Fecal dimeric M2 -pyruvate kinase (tumor M2 - PK) in the differential diagnosis of functional and organic bowel disorders. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15:1630 -1634.
126. Joishy M., Walker T.R., Land M.L. i wsp.: Fecal Lactoferrin is a Sensitive and Specific Marker of Disease Activity in Children and Young Adults With Inflammatory Bowel Disease. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 2007, 44: 414-422.
127. Judd TA., Day AS., Lemberg DA. i wsp.: Update of fecal marker of inflammation in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011,26(10):1493-1499.
128. Kallel L., Avadi I., Matri S. i wsp.: Fecal calprotectin is a predictive marker of relapse in Crohn's disease involving the colon: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010,22(3):340-345.
129. Kamińska B., Landowski P., Korzon M. i wsp.: Zależność pomiędzy składem beztlenowej flory bakteryjnej jelita grubego a stopniem aktywności nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2003, 5(2): 113-116.
130. Kamińska B., Landowski P., Szarszewski A.: Ocena flory bakteryjnej jelita grubego, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii redukujących siarczany w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Materiały Naukowe XI Kongresu PTG Warszawa 2004: 141 – 142*
131. Kamogawa Y., Minasi L. A., Carding S. R. i wsp.: The relationship of IL-4 and INF gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell.* 1993, 75: 985-995.
132. Kane S.V., Sandborn W.J., Rufo P.A. i wsp.: Fecal Lactoferrin Is a Sensitive and Specific Marker in Identifying Intestinal Inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* 2003, 98:1310-1314.
133. Kargulewicz A., Stankowiak-Kulpa H., Grzymisławski M.: Rola leczenia żywieniowego w chorobie Leśniowskiego - Crohna. *Gastroenterol. Pol.* 2010,17(4):300-303.
134. Karlinger K., Gyorke T., Mako E. i wsp.: The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Radiol.* 2000, 35(3): 154-167.
135. Karolewska-Bochenek K., Łazowska I., Szamotulska K. i wsp.: Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland; a 2-year prospective study's preliminary findings. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004,39(1): S308.

136. Kayazawa M., Saitoh O., Kojima K. i wsp.: Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am. J. Gastroenterol.* 2002, 97:360-369.
137. Kim C.W., Kim J.I., Park S.H.: Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Korean J. Gastroenterol.* 2003, 42: 387–393.
138. Kinouchi Y., Van Heel D., Cadon L. i wsp.: Transmission dysequilibrium testing confirms the association of the TNF- α 1031 C allele with Crohn's disease (abstr). *Gastroenterol.* 2001; Suppl:2321.
139. Klincewicz B., Ignyś I., Cichy W.: Coexistence of coeliac disease and inflammatory bowel disease in children. *Gastroenterol. Pol.* 2007.14(1):23-401
140. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, i wsp.: *NOD2*-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005, 307 :731–734.
141. Kobelska-Dubiel N., Ignyś I., Cichy W. i wsp.: Kliniczne wskaźniki w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2007, 9(3): 167-171
142. Koizumi M., King N., Lobb R. i wsp.: Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1992, 103: 840-847.
143. Kolho K.L, Raivio T., Lindahl H. i wsp.: Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroentrol.* 2006, 41: 720-725
144. Konikoff MR., Denson LA.: Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006,12(6):524-534.
145. Korczowski R., Romańczuk W., Ryzko J., i wsp.: Etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit. *Ped. Pol.* 1991,1-2: 68 – 72
146. Koss K., Maxton D., Jankowski A.Z.: Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention. *Colorectal Disease* 2007,10:244-248.
147. Kostrzewa M., Toporowska-Kowalska E., Wąsowska-Królikowska K.: Wczesna manifestacja kliniczna nieswoistego zapalenia jelit u dzieci z polimorfizmem genu *CCRS*. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(3):149-154.
148. Kostrzewa M., Toporowska-Kowalska E., Wąsowska-Królikowska K.:Złożone zjawiska immunologiczne w przewlekłych chorobach zapalnych jelit. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(3):166-169.

149. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, i wsp.: Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli Nissle 1917* is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 2004,53(11):1617-23.
150. Krzesiek E., Pytrus T., Iwańczak B.: Zmiany okołodbytnicze u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna w materiale własnym. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(2):92-96.
151. Kubasińska I., Pławski A., Czkwianianc E.: Częstość występowania polimorfizmów genu *NOD2/CARD15* w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci – materiał własny. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(2):83-85.
152. Kubasińska I., Pławski A., Kolska-Kicińska M., i wsp.: Polimorfizm genu *NOD2/CARD15* w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci i jego korelacja z przebiegiem klinicznym w chorobie Leśniowskiego-Crohna. *Pediatrics Współczesna* 2009,11,4, 135-138
153. Kugathasan S., Judd R. H., Hoffmann R. G. i wsp.: Wisconsin Pediatric Inflammatory Bowel Disease Alliance. *J. Pediatr.* 2003, 143(4): 525-531.
154. Kumar Y., Tapuria N., Kirmani N i wsp.: Tumor M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007,19(3):265-276.
155. Kusugami K., Matsura T., West G. A. i wsp.: Loss of interleukin-2-producing intestinal CD4+ T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1991, 101(6): 1594-1605.
156. Lakatos P., Fischer S., Lakatos L.: Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take “toll” ? *World J Gastroenterol.* 2006,12: 1829-1841
157. Lala S., Ogura Y., Osborne C. i wsp.: Crohn's disease and the *NOD2* gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterol.* 2003, 125(1): 47-57.
158. Langholz E., Munkholm P., Krasilnikoff P.A. i wsp.: Inflammatory bowel diseases with onset in childhood. Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 32:139-147.
159. Langhorst J., Eisenbruch S., Koelzer J. i wsp.: Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol.* 2008,103(1):162-169.

160. Łazowska-Przeorek I., Karolewska-Bochenek K., Albrecht P.: Pediatrizy już to wiedzą – nadchodzi epidemia choroby Leśniowskiego - Crohna. *Terapia Gastroenterologia* 2009,6(226):24-32.
161. Leach ST., Yang Z., Messyna I, i wsp.: Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2007,42(11):1321-1331.
162. Lee J. C., Lennard-Jones J. E.: Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterol.* 1996, 111:587–596.
163. Lees C.W., Satsangi J.: Genetics of Inflammatory Bowel Disease: Implications for Disease Pathogenesis and Natural History. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009,3(5):513-534
164. Lesage J., Zouali H., Cezard J. P. i wsp.: *CARD15/NOD2* mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 70: 845-857.
165. Li R., Liu J., Xue H. i wsp.: Diagnostic value of cecal tumor M2-pyruvate kinase for CRC screening: A systematic review and metaanalysis. *Int J Cancer* 2012, doi: 10.1002/ijc.27442
166. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa człowieka a probiotyki. *Zakażenia.* 2004,6:47-5184
167. Lichtenstein G.R., Hanauer B., Sandborn W.J. i wsp.: Postępowanie w chorobie Leśniowskiego-Crohna. *Gastroenterol. Prakt.* 2009,1(1):8-34.
168. Liu Y, van Kruiningen H.J., West A.: Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterol.* 1995,5: 1589 – 1590
169. Loftus E. V., Jr. Silverstein M. D., Sandborn W. J. i wsp.: Crohn's disease in Olmsted County, Minesota, 1940-93: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterol.* 1998, 114: 1161-1168.
170. Louis E., Collard A., Oger A. F. i wsp.: Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut.* 2001, 49: 777–782.
171. Louis E., Peeters M., Franchimont D. i wsp.: Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 119(1): 64-68.

172. Lundberg JO., Hellstrom PM., Fagerhol MK. i wsp.: Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel marker of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005,2(2):96-102.
173. Macho Fernandez E, Valenti V, Rockel C, i wsp.: Anti-inflammatory capacity of selected *Lactobacilli* in experimental colitis is driven by *NOD2*-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*. 2011,60(8):1050-1059.
174. Magro F, Lopes S, Rodrigues S, i wsp.: How to Manage Pouchitis in Ulcerative Colitis? *Curr Drug Targets*. 2011,12(10): 1454-61
175. Mao R., Ciao Y.L., Gao X. i wsp.: Fecal calprotectin in relapse of inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis* 2012 - w druku
176. Marc A., Sidler MD, Steven T. i wsp.: Fecal SIOOA12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis* 2008,14(3):359-366.
177. Mathew C. G., Lewis C. M.: Genetics of inflammatory disease: progress and prospects. *Hu. Mol. Gen.* 2004, 13 (Spec. 1): 161-168.
178. Matsura T., West G. A., Youngman K. R. i wsp.: Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1993, 104: 448-458.
179. Mazurek S.: Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2007,4:99-124.
180. McClane S. J., Rombeau J. L.: Cytokines and inflammatory bowel disease: a review. *J. Parent. Ent. Nutr.* 1999, 23(supp. 5): 20-24.
181. Meder A., Świątkowski M., Meder G. i wsp.: Ocena jakości życia oraz współistniejących zaburzeń lękowo-depresyjnych u chorych z nieswoistą chorobą zapalną jelit w trakcie rzutu choroby i dalszej 11-miesięcznej obserwacji. *Gastroenterol. Pol.* 2010,17(4):273-279.
182. Medzhitov R., Janeway C. A.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 1997, 9(1): 4-9.
183. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, i wsp.: Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*. 2004,53(1):108-114.

184. Mitsuyama K., Toyonaga A., Sasaki E. i wsp.: IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1994, 96(3): 432-436.
185. Molander P., Af Björkesten C-G., Mustonen H. i wsp.: Fecal calprotectin concentration predicts outcome in inflammatory bowel disease after induction therapy with TNF- α blocking agents. *Inflamm Bowel Dis* 2012 – w druku
186. Monsen U., Bernell O., Johansson C., Hellers G.: Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991, 26: 302–306.
187. Montgomery S. M., Morris D. L., Pounder R. E. i wsp.: Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1999, 116: 796-803.
188. Moum B., Ekbohm A., Vatan M.H. i wsp.: Clinical course during 1st year after diagnosis in ulcerative colitis and Crohn's disease. Results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990-1993, *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 32:1005-1012.
189. Munkholm P., Langholz E., Nielsen O. H. i wsp.: Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962–87: a sixfold increase in incidence. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992, 27: 609–614.
190. Mussell M., Bocker U., Nagel N. i wsp.: Reducing psychological distress in patients with inflammatory bowel disease by cognitive-behavioural treatment: exploratory study effectiveness. *Scand. J. Gastroenterol.* 2003, 38(7): 755-762.
191. Mylonaki M., Langmead L., Pantos A. I wsp.: Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004, 16(8): 775-778.
192. Neut C., Bulois P., Desreumaux P. i wsp.: Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2002, 97: 939–946.
193. Nielsen L. L., Nielsen N. M., Melbye M. i wsp.: Exposure to measles in utero and Crohn's disease: Danish register study. *B. M. J.* 1998, 316: 196-197.
194. Nieuwenhuis E.E.S., Escher J.C.: Early onset IBD: What's the difference? *Dig. Liver Dis.*, 2008, 40: 12-15.

195. Novacek G., Weltermann A., Sobala A. i wsp.: Inflammatory Bowel Disease is a risk factor for recurrent venous thromboembolism. *Gastroenterology* 2010,139:779-787.
196. Ogura Y., Bonen D. K., Inohara N. i wsp.: A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411: 603-606.
197. Ogura Y., Inohara N., Benito A. i wsp.: *NOD2*, a *NOD1*/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 4812-4818.
198. Ogura Y., Lala S., Xin W. i wsp.: Expression of *NOD2* in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* 2003, 52(11): 1591-1597.
199. Olafsdottir E., Aksnes L., Fluge Gi, i wsp.: Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr.* 2002, 91: 45-50
200. Oliva-Hemker M., Fiocchi C.: Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:112–128.
201. Online Mendelian Inheritance in Man.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
202. Ordonez F., Lacaille F., Canioni D. i wsp.: Pediatric ulcerative colitis associated with autoimmune disease: a distinct form of inflammatory bowel disease ?
Inflamm Bowel Dis 2012 - w druku
203. Orholm M., Munkholm P., Langholz E. i wsp.: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324: 84–88.
204. Panaccione R., Ghosh S.: Optimal use biologics in the management of Crohn's disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2010,3(3):179-189
205. Pardi D. S., Tremaine W. J., Sandborn W. J. i wsp.: Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2000, 95: 1480-1485.
206. Paul G., Khare V., Gasche C.: Inflamed gut mucosa: Downstream of interleukin-10. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012,42(1):95-109
207. Pebody R. G., Paunio M., Ruutu P. : Measles, measles vaccination, and Crohn's disease. Crohn's disease has not increased in Finland. *Brit. Med. J.* 1998, 316: 1745-1746.
208. Peeters M., Cortot A., Vermeire S. i wsp.: Familial and sporadic inflammatory bowel disease: different entities? *Inflamm Bowel Dis* 2000, 6: 314–320.

209. Peeters M., Nevens H., Baert F. i wsp.: Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996, 111: 597–603.
210. Pekow JR., Kwon JH.: MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18(1):187-193.
211. Pera A., Bellando P., Caldera D, i wsp.: Colonoscopy in inflammatory bowel disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. *Gastroenterology* 1987, 92, 181-185
212. Peyrin-Biroulet L., Cieza A., Sandborn WJ. i wsp.: Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut* 2012,61(2):241-247.
213. Phavichitr N., Cameron D. J., Catto-Smith A. G.: Increasing incidence of Crohn's disease in Victorian children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003, 18(3): 329-332.
214. Pierdomenico M., Stronati L., Costanzo M. i wsp.: New insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease: transcription factors analysis in biopsic tissues from pediatric patients. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011, 52(3):271-279.
215. Plevy S.: Do serological markers and cytokines determine the indeterminate? *J. Clin Gastroenterology* 2004, 126: 414-424
216. Podolsky D. K.: Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2002, 6(347): 417-429.
217. Polito J. M., Childs B., Mellits E. D. i wsp.: Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterol.* 1996, 111: 580–586.
218. Pustkowski M.: Choroba Leśniowskiego-Crohna. *Żyjmy dłużej.* 1999, 11; <http://resmedica.pl/zdart119914.html>
219. Pytrus T., Iwańczak B., Krzesiek E. i wsp.: Manifestacje pozajelitowe i powikłania nieswoistych zapaleń jelit dotyczące skóry i błon śluzowych. *Pediatrica Współczesna* 2011,13(2):86-91.
220. Pytrus T.: Bezpośrednie koszty leczenia ambulatoryjnego dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Pediatrica Współczesna* 2011,13(2):97-101.
221. Radwan P., Skrzydło-Radomańska B.: Objawy i rozpoznanie nieswoistych zapaleń jelit. *Terapia Gastroenterologia* 2009,6(226):38-41.
222. Rath H. C., Schultz M., Freitag R. i wsp.: Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect. Immun.* 2001, 69: 2277-2285.

223. Ravikoff JE., Cole EB., Korzenik JR.: Barriers to enrollment in inflammatory bowel disease randomized controlled trials: An investigation of patients perspectives. *Inflamm Bowel Dis* 2012 - w druku
224. Ravikumara M., Sandhu B.K.: Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in Childhood. *Indian. J. Pediatr.* 2006, 73: 717-721.
225. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, i wsp.: Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* 1999,354(9179):635-9.
226. Renzi D., Pellegrini B., Tonelli F. i wsp.: Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am. J. Pathol.* 2000, 157(5): 1511-1522.
227. Ringel Y., Drossman D. A.: Psychosocial aspects of Crohn's disease. *Surg. Clin. North. Am.* 2001, 81(1): 231-252.
228. Rioux J. D., Daly M. J., Silverberg M. S. i wsp.: Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat. Genet.* 2001, 29: 223–228.
229. Rioux J. D., Silverberg M. S., Daly M. J. i wsp.: Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 66: 1863-1870.
230. Roberfroid MB., Bornet Bouley C., Cummings JH.: Colonic Microflora: Nutrition and Health. Summary and Conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] Workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr Rev* 1995,53, 127–130
231. Rocha F., Laughlin R., Musch M. W. i wsp.: Surgical stress shifts the intestinal *Escherichia coli* population to that of a more adherent phenotype: role in barrier regulation. *Surgery.* 2001, 130: 65–73.
232. Rosińska A., Grzeszczak I., Zawirska A., i wsp.: Zakażenia grzybami drożdżopodobnymi z rodzaju *Candida* u dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit. *Pediatrics Polska* 2007,82(3):220-226
233. Roth M. P., Petersen G. M., McElree C. i wsp.: Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterol.* 1989; 96:1016–1020.
234. Ruemmele F.M., Targan S.R., Levy G. i wsp.: Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1998, 115: 822-829

235. Rumsey J., Valentine J., Saleh A. i wsp.: Inhibition of phagosome maturation and survival of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in polymorphonuclear leukocytes from Crohn's disease patients. *Med Sci Monit.* 2006,12: 130-139
236. Russel M. G. V. M., Stockbrugger R. W.: Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996, 31: 417-427.
237. Russel M. G., Pastoor C. J., Janssen K. M. i wsp.: Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 1997, 223: 88–91.
238. Ryżko J., Dądalska M., Socha P. i wsp.: Odrębności pediatryczne nieswoistych zapaleń jelit. *Terapia Gastroenterologia* 2009,6(226):33-37.
239. Ryżko J., Kierkuś J., Ryżko J.: Postępowanie dietetyczne i żywieniowe w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci z uwzględnieniem zaleceń European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). *Pediatrics Współczesna* 2011,13(2):103-110.
240. Sandborn W. J., Loftus E. V., Colombel J. F. i wsp.: Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001, 7: 192–201.
241. Sandler R. S., Sandler D. P., McDonnell C. W. i wsp.: Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis. *Am. J. Epidemiol.* 1992, 135: 603–608.
242. Sans M., Salas A., Soriano A. i wsp.: Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterol.* 2001, 120: 1162-1172.
243. Sartor R. B.: Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 1997, 92: 5S-11S.
244. Satsangi J., Parkes M., Louis E. i wsp.: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat. Genet.* 1996, 14:199-202.
245. Satsangi J., Rosenberg W. M. C., Jewell D. P.: The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1994, 6: 413–416.
246. Sawczenko A., Sandahu B.K., Logan R.F. i wsp.: Prospective Survey of childhood inflammatory bowel disease in British Isles. *Lancet* 2001, 357: 1093-1094.

247. Schmitz F.: Predictive genetics for chronic inflammatory bowel disease – Pathways to personalized therapy ? *Gastroenterologie* 2012 – 1-2 w druku
248. Scholmerich J.: Inflammatory bowel disease at the end of its first century. *Hepato. Gastroenterol.* 2000, 47: 2-4.
249. Schreiber S., Heinig T., Thiele H. G. i wsp.: Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 1995, 108(5): 1434-1444.
250. Schreiber S., Nikolaus S., Hampe J.: i wsp.: Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998, 42: 477-484.
251. Schreiber S., Rosenstiel P., Albrecht M. i wsp.: Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat. Rev. Genet.* 2005, 6(5): 376-388.
252. Schröder O, Naumann M, Shastri Y, i wsp.: Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2007; 26: 1035-1042
253. Schwartz A, Jacobi M., Frick JS. i wsp.: Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr.* 2010,157(2): 240-244
254. Schwartz A., Jacobi M., Frick J.S. i wsp.: Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *The Journal of Pediatrics.* 2010:1-6. (www.jpeds.com)
255. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, , i wsp.: Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1998, 66: 5224-5231
256. Sendid B., Quinton J. F., Charrier G. i wsp.: *Anti-Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1998, 93: 1306–1310.
257. Shaoul R., Sladek M., Turner D. i wsp.: Limitations of fecal calprotectin at diagnosis in untreated pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012. doi:10.1002.ibd.21875.
258. Shikhare G., Kugathasan S.: Inflammatory bowel disease in children: current trends. *J Gastroenterol* 2010,45:673-682.
259. Sidler M.A., Leach S.T., Day A.S.: Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14:359-366.

260. Silletti R.P., Lee G., Ailey E.: Role of Stool Screening Tests In Diagnosis of Inflammatory Bacterial Enteritis and In Selection of Specimens Likely To Yield Invasive Enteric Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 1161-1165.
261. Sładek M., Ćmiel A.: Ocena wyników wybranych badań laboratoryjnych u pacjentów z noworozpoznaną chorobą Leśniowskiego-Crohna mającą początek przed 18 rokiem życia. *Pediatrics Współczesna* 2011,13(3):143-148.
262. Socha P., Dądalski M., Kierkuś J. i wsp.: Podłoże genetyczne nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Standardy Medyczne* 2010,1(7):53-58.
263. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., i wsp.: *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008,105(43):16731-6
264. Standaert-Vitse A, Jouault T, Vandewalle P i wsp. *Candida albicans* is an immunogen for *anti-Saccharomyces cerevisiae*. *Gastroenterology* 2006, 130: 1764-75.
265. Struś M., Uhlig H., Powrie F., i wsp: Rola bakterii w zwierzęcych modelach nieswoistego zapalenia jelit. *Gastroenterol. Pol* 2005, 12: 15 – 20
266. Subhani J., Montgomery S. M., Ounder R. E. i wsp.: Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998, 42: A40.
267. Sudo I, Igawa M, Tsuchiya K, i wsp.: A study to determine fecal lactoferrin in patients with ulcerative colitis. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1993, 90: 824
268. Sugimura K., Taylor K. D., Lin Y. i wsp.: A novel *NOD2/CARD15* haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72: 509-518.
269. Sutherland AD., Geary RB., Frizelle FA.: Review of fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum* 2008,51(8):1283-1291.
270. Sutherland L., Singleton J., Sessions J. i wsp.: Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut.* 1991, 32: 1071-1075.
271. Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A. i wsp.: Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2002, 122: 44-54.
272. Szachta P., Roszak D., Gałęcka M. i wsp. Nieinwazyjne markery zapalne nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Gastroenterol. Pol.* 2009, 16(5):399-401.

273. Szajewska H., Horvath A., Dziechciarz P.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit. – przegląd systematyczny. *Pediatrica Współczesna* 2007, 9: 266 – 275
274. Szarpińska – Kwaszewska J.: Beztlenowe laseczki – *Clostridium*. W: „Diagnostyka bakteriologiczna” Red Szewczyk E. 2005, 16: 159 – 167
275. Szczepanik M., Cichy W., Raniszewska M. i wsp.: Wybrane zagadnienia epidemiologii i etiopatogenezy choroby Leśniowskiego-Crohna. *Pediat. Pol.* 2006,81(3):164-170
276. Szczepanik M., Krawczyński M., Cichy W. i wsp.: Choroba Leśniowskiego-Crohna: powiązania bakteria-odpowiedź immunologiczna-gen. *Pediat. Pol.* 2006,81(3):211-216.
277. Szczepanik M., Krawczyński M., Cichy W. i wsp.: Genetyczne aspekty choroby Leśniowskiego-Crohna. *Pediat. Pol.* 2006,81(3):201-210.
278. Takeuchi O., Hoshino K., Akira S. i wsp. TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 2000, 165: 5392–5396.
279. Talbot I.C.: Indeterminate colitis: a pathologist’s view. *Digestive and Liver Disease* 2005,37:713-715.
280. Thayu M., Denson L.A., Shults J. i wsp.: Determinants of changes in linear growth and body composition in incident pediatric Crohn’s disease. *Gastroenterology* 2010,139:430-438.
281. Thompson N. P., Driscoll R., Pounder R. E. i wsp.: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *B. M. J.* 1996, 312: 95–96.
282. Thompson N. P., Montgomery S. M., Wadsworth M. E. J. i wsp.: Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two national longitudinal birth cohorts. *Europ. J. Gastroenterol.* 2000, 12: 25-30.
283. Thompson N. P., Pounder R. E., Wakefield A. J.: Perinatal and childhood risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995, 7: 385-390.
284. Ting J. P., Davis B. K.: CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23: 387-414.
285. Tomer G., Ceballos C., Concepcion E. i wsp.: *NOD2/CARD15* variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn’s disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2003, 98(11): 2479-2484.

286. Tonus C, Neupert G, Sellinger M. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal Tumor M2-PK. *World J. Gastroenterol.* 2006, 12: 7007–7011
287. Toporowska-Kowalska E., Wąsowska-Królikowska K.: Postępy w gastroenterologii w 2010 roku. *Med.Prakt.* 2011, 6(78):8-14
288. Turner D., Leach ST., Mack D. i wsp.: Faecal calprotectin, lactoferrin, M2-pyruvate kinase and S100A12 in severe ulcerative colitis: a prospective multicentre comparison of predicting outcomes and monitoring response. *Gut* 2010,59(9):12-7-1212.
289. Tyler AD., Milgrom R., Xu W. i wsp.: Antimicrobial antibodies are associated with a Crohn's Disease-Like Phenotype after ileal pouch-anal anastomosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2012– w druku.
290. Urne F. U., Paerregaard A.: Chronic inflammatory bowel disease in children. An epidemiological study from eastern Denmark 1998-2000. *Ugeskr-Laeger.* 2002, 164(49): 5810-5814.
291. van der Zaag-Loonen H.J., Casparie M., Taminiau J.A.J.M. i wsp.: The Incidence of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in the Netherlands: 1999-2001. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004, 38: 302-307.
292. Van Heel D. A., Dechairo B. M., McGovern D. P. i wsp.: The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with *CARD15* and IBD5 disease-associated variants. *Hum. Mol. Genet.* 2003, 12: 2569-2575.
293. Van Heel D. A., Fisher S. A., Kirby A. i wsp.: Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13(7): 763-770.
294. Van Heel D. A., Udalova I. A., De Silva A. P. i wsp.: Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF-κB transcription factors. *Hum. Mol. Genet.* 2002, 11: 1281–1289.
295. Van Limbergen J., Russel RK., Drummond HE., i wsp.: Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008,135(4):114-1122.
296. Veereman-Wauters G., de Ridder L., Veres G. i wsp.: ESPGHAN IBD Porto Group commentary on risk of infection and prevention in pediatric IBD patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012- w druku

297. Vermaire S., Wild G., Kocher K. i wsp. *CARD15* Genetic Variation in a Quebec Population: Prevalence, Genotype-Phenotype Relationship, and Haplotype Structure. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 71: 74-83.
298. Vermeire S., Van Assche G., Rutgeerts P.: Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006, 55: 426-431.
299. Walker T.R., Land M.L., Kartashov A. i wsp.: Fecal Lactoferrin Is a Sensitive and Specific Marker of Disease Activity in Children and Young Adults With Inflammatory Bowel Disease. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 2007, 44:414-422.
300. Walkiewicz D., Werlin S.L., Fish D. i wsp.: Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008,14(5):669-673.
301. Wiskin A.E., Wootton S.A., Cornelius V.R. i wsp.:No relation between disease activity measured by multiple methods and REE in childhood Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012.54(2)271-276.
302. Wurzelmann J. I., Lyles C. M., Sandler R. S.: Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Digest. Dis. Sci.* 1994, 39: 555-560.
303. Yamazaki K., Takazoe M., Tanaka T. i wsp.: Absence of mutation in the *NOD2/CARD15* gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J. Hum. Genet.* 2002, 47: 469-472.
304. Yang H., Taylor K. D., Rotter J. I.: Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol. Genet. Metab.* 2001; 74:1–21.
305. Yogesh K., Tapuria N., Kirmani N. i wsp.: Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. *Europ J of Gastroenterol Hepatol.* 2007, 19 (3):265-276
306. Zagórowicz E.: Zasady leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohna. *Terapia Gastroenterologia* 2009,6(226):42-46.
307. Zwolińska – Weisło M., Budak A., Trojanowska D., i wsp.: Badanie wpływu grzybów *Candida* na przebieg wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Materiały Naukowe XI Kongresu PTG* , Warszawa; 2004; czerwiec:126 – 127

X. ANEKS

Tabela 1. PCDAI (ang.: Peadiatric Crohn's disease activity index) - indeks aktywności choroby Leśniowskiego – Crohna w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego

Objawy	punkty
Bóle brzucha:	
brak	0
słabe	5
Silne	10
Stolce	
< 2 bez krwi	0
2-5 luźne/krew	5
>5 lub znaczne krwawienie	10
Samopoczucie	
dobrze	0
nieco gorsze	5
złe	10
Stężenie Hb (g/dl)	
>12	0
10-12	2,5
<10	5
OB	
<20	0
20-50	2,5
>50	5
Albuminy	
>35	0
31-35	5
<31	10
Wskaźnik Cole'a	
>85	0
80-85	5
<85	10

Badanie palpacyjne brzucha:	
bez tkliwości i oporu	0
nieznaczna/guz	5
wyraźna/i guz	10
Zmiany okołodbytnicze	
brak	0
niewielkie, bezbolesne	5
przetoki, bolesność lub ropień	10
Objawy pozajelitowe	
brak	0
1 z objawów	5
2 lub więcej	10

Ocena aktywności:

brak aktywności klinicznej choroby: 0 -10 punktów

łagodna postać choroby 11 - 25 punktów

umiarkowana postać choroby 26 -50 punktów

ciężka postać choroby >51 punktów

Tabela 2. Indeks aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wg. Truelova – Wittsa w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego

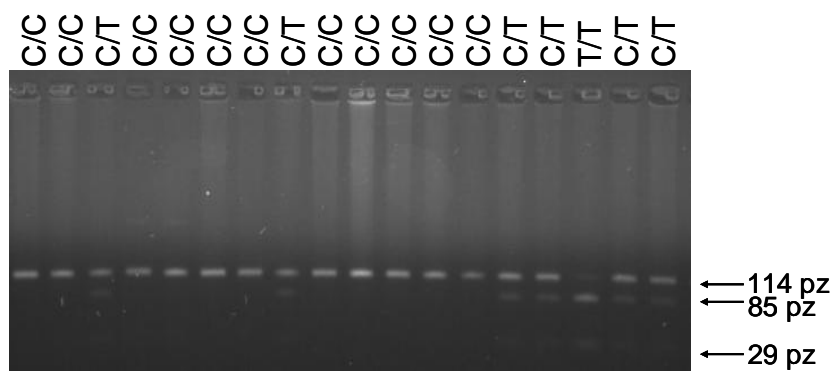
OBJAW	0 pkt	1 pkt	2 pkt
stolce biegunkowe	0-2	2-6	>6
krw w kale	brak	śląd	dużo
temperatura ciała	norma	do 38°C	>38°C
stężenie hemoglobiny (g/dl)	>12.0	10.0-12.0	<12.0
OB	<10	10-30	>30
wsk. Cole,a	>85%	80-85%	<85%

Ocena aktywności:

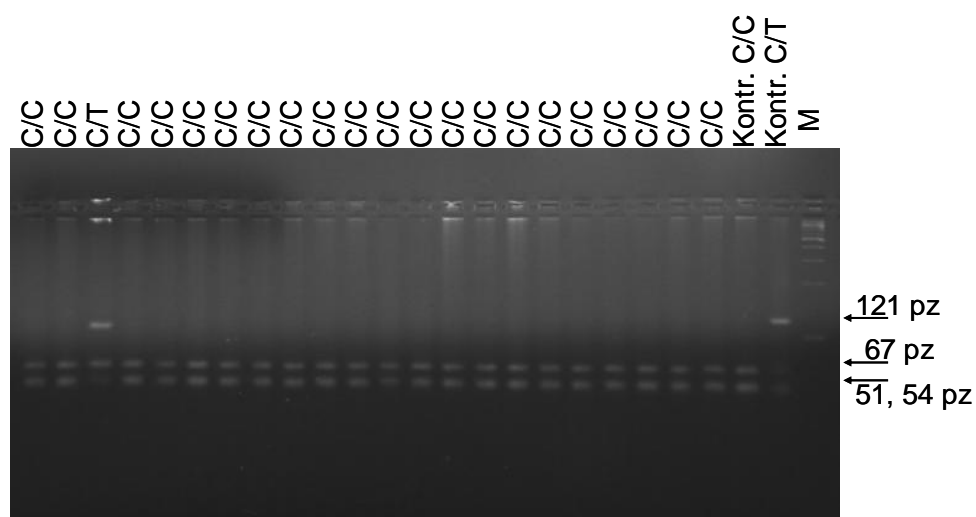
0-4pkt postać łagodna

5-8pkt umiarkowana postać

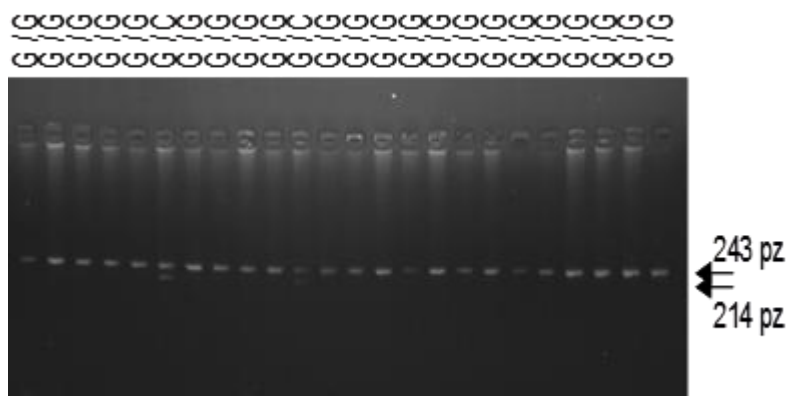
9-12pkt ciężka postać



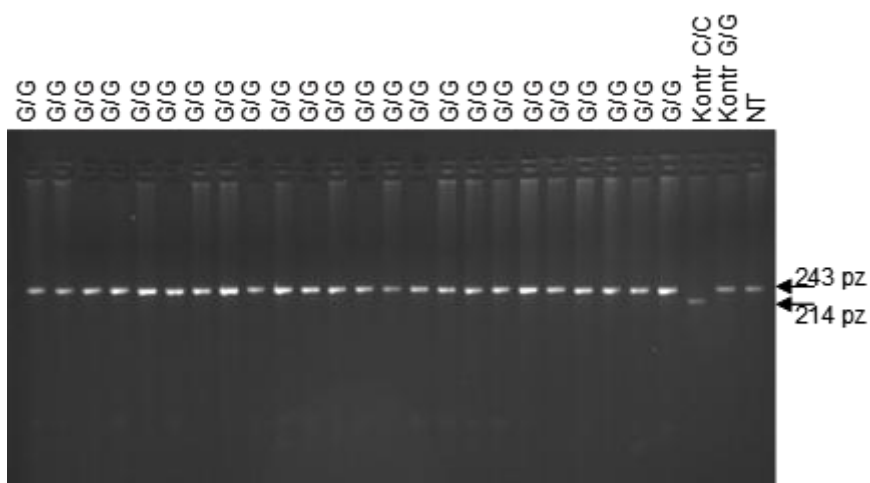
**Rycina 41. Badanie występowania polimorfizmów c.802C>T w grupie chorych.
Genotypy przedstawiono na górnej części żelu**



**Rycina 42. Badanie występowania polimorfizmu c.2104C>T w grupie chorych.
Genotypy podano w górnej części żelu.**

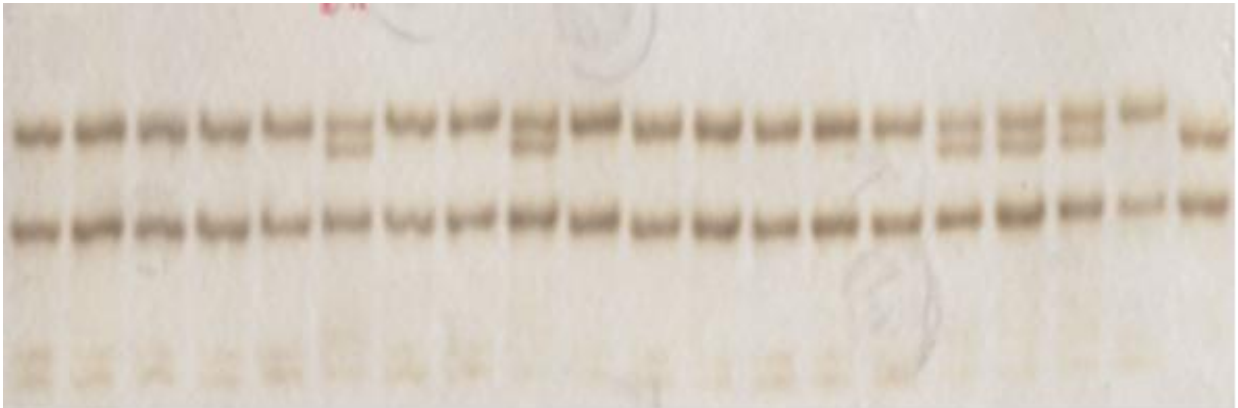


**Rycina 43. Badanie występowania polimorfizmu c.2722G>C w grupie chorych.
Genotypy podano w górnej części żelu.**



**Rycina 44. Badanie występowania polimorfizmu c.2722G>C w grupie kontrolnej.
Genotypy podano w górnej części żelu. Kontrole o znanych genotypach umieszczono na
torach oznaczone kontr. C/C o kontrola G/G, oraz nie trawiony produkt (NT) PCR
umieszczono w lewej części żelu**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Rycina 45. Analiza PCR-SSCP dla fragmentu genu *NOD2* obejmującego c.3020ins

Tabela 60. Zestawienie genotypów uzyskane w trakcie badań DNA dla grupy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit

Nr pacjenta	Rozpoznanie	c.3020insC	c.2104C>T	c.802C>T	c.2722G>C
2194	CU	WT	C/C	C/T	G/G
2195	CU	het	C/C	C/T	G/G
2196	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2197	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2198	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2199	CD	het	C/C	C/T	G/G
2200	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2202	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2203	CD	het	C/C	T/T	G/C
2205	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2206	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2225	IC	WT	C/C	C/T	G/G
2226	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2227	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2228	CD	hom	C/C	T/T	G/G
2229	CD	hom	C/C	T/T	G/G
2230	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2231	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2232	CD	WT	C/T	T/T	G/G
2233	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2234	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2301	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2302	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2303	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2304	CU	het	C/C	C/C	G/G
2305	CD	WT	C/T	T/T	G/G
2306	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2307	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2308	CD	het	C/C	C/T	G/G
2309	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2310	IC	het	C/C	C/T	G/G
2311	CD	WT	C/T	T/T	G/G
2312	CD	het	C/C	C/T	G/G
2313	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2314	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2315	IC	het	C/C	C/C	G/G
2316	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2317	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2319	IC	WT	C/C	C/C	G/G

2320	IC	WT	C/C	T/T	G/G
2321	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2322	CU	WT	C/C	C/T	G/G
2323	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2324	CD	WT	C/C	C/T	G/G
2325	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2326	CD	WT	C/T	C/T	G/G
2327	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2328	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2329	CD	WT	C/C	T/T	G/G
2330	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2331	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2332	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2333	CD	het	C/C	C/C	G/G
2334	CU	WT	C/C	C/T	G/G
2335	CU	het	C/C	C/T	G/G
2336	IC	het	C/C	T/T	G/G
2337	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2338	IC	WT	C/C	C/T	G/G
2339	CU	het	C/C	C/T	G/G
2340	IC	WT	C/T	C/T	G/G
2342	CD	WT	C/T	C/T	G/G
2343	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2344	CU	het	C/C	C/T	G/G
2345	IC	WT	C/C	C/C	G/G
2347	CU	hom	C/C	T/T	G/G
2348	CU	WT	C/C	C/T	G/G
2349	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2350	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2351	CU	WT	C/C	C/T	G/C
2352	CU	WT	C/C	C/T	G/G
2353	CD	WT	C/C	C/T	G/C
2354	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2355	IC	WT	C/C	C/T	G/G
2356	CD	WT	C/T	T/T	G/C
2357	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2358	CD	WT	C/C	C/C	G/G
2359	IC	WT	C/T	C/T	G/G
2360	IC	WT	C/C	C/T	G/G
2361	IC	WT	C/C	C/T	G/G
2362	CU	WT	C/C	C/C	G/G
2363	CD	WT	C/C	T/T	G/C
2364	CU	WT	C/C	C/T	G/G

Legenda:

WT - typ dziki (ang.wilde type)

het polimorfizm c.3020insC w układzie heterozygotycznym

homo polimorfizm c.3020insC w układzie homozygotycznym

CD - choroba Leśniowskiego-Crohna

CU - Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

IC - Nieokreślone zapalenie jelita grubego