

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Zastosowanie proteomiki w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu
klinicznego wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby
Leśniowskiego-Crohna**

Lek. Magdalena Andrzejewska

Promotor: Prof. dr hab. Marian Grzymiśławski

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych

Wydział Medyczny

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2020

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy
Panu Prof. dr hab. Marianowi Grzymiśławskiemu
za pomoc merytoryczną udzieloną w przygotowaniu niniejszej pracy,
okazane wsparcie i życzliwość

Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. n. med. Zenonowi J. Kokotowi
Kierownikowi Katedry Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
za umożliwienie realizacji niezbędnych w przygotowaniu pracy badań
naukowych, pomoc merytoryczną i życzliwość

Składam serdeczne podziękowania
Panu dr hab. n. med. Janowi Matysiakowi
Kierownikowi Katedry Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
za umożliwienie realizacji niezbędnych w przygotowaniu pracy badań
naukowych, pomoc merytoryczną i życzliwość

Składam serdeczne podziękowania
Pracownikom Katedry Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
a w szczególności **mgr Elizie Matuszewskiej** i **dr Pawłowi Derezińskiemu**
za wszelką udzieloną pomoc, prowadzenie prac doświadczalnych
oraz cenne wskazówki podczas realizacji pracy

SPIS TREŚCI:

WYKAZ SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	
1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit.....	6
1.1.1. Definicja nieswoistych chorób zapalnych jelit.....	6
1.1.2. Epidemiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit	7
1.1.3. Patogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit.....	9
1.1.4. Objawy kliniczne nieswoistych chorób zapalnych jelit	13
1.1.5. Diagnostyka nieswoistych chorób zapalnych jelit	19
1.1.6. Leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit	26
1.2. Proteomika.....	32
2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA.....	35
3. MATERIAŁ I METODY.....	36
3.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	36
3.2. Charakterystyka grupy badanej.....	36
3.3. Metodyka badań.....	40
4. WYNIKI.....	47
4.1. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z wynikami osób zdrowych.....	48
4.2. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na Leśniowskiego-Crohna z wynikami osób zdrowych.....	59
4.3. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na chorobę Leśniowskiego- Crohna z wynikami w grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego.....	67
4.4. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit (wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub chorobę Leśniowskiego - Crohna) z wynikami w grupie kontrolnej.....	79
4.5. Porównanie wyników analizy proteomicznej pacjentów chorujących na nieswoiste choroby zapalne jelit będących w okresie zaostrzenia choroby z wynikami pacjentów będących w okresie remisji.....	91
5. DYSKUSJA.....	99

6. WNIOSKI.....	111
7. STRESZCZENIE.....	113
8. SUMMARY.....	116
9. WYKAZ TABEL I RYCIN.....	119
10. PIŚMIENICTWO.....	124

WYKAZ SKRÓTÓW:

ACN – acetonitryl

CDAI – indeks aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. *Crohn's Disease Activity Index*)

ChLC – choroba Leśniowskiego-Crohna

CRP – białko C-reaktywne (ang. *C- reactive protein*)

GA – algorytm genetyczny (ang. *genetic algorithm*)

HCCA – kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (ang. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

MALDI – laserowa desorpcja i jonizacja wspomagana matrycą (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MALDI-TOF-MS – spektrometria mas z laserową desorpcją i jonizacją wspomaganą matrycą i z detektorem czasu przelotu (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)

MS – spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)

NChZJ – nieswoiste choroby zapalne jelit

SNN – nadzorowana sieć neuronowa (ang. *supervised neural network*)

QC – szybki klasyfikator (ang. *quick classifier*)

WZIG – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

1. WSTĘP

1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit

1.1.1. Definicja nieswoistych chorób zapalnych jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to grupa przewlekłych schorzeń zapalnych przewodu pokarmowego o wieloczynnikowej i nie do końca poznanej etiologii. Przyjmuje się, że w ich rozwoju biorą udział czynniki genetyczne, środowiskowe oraz immunologiczne. Charakterystyczny dla tych chorób jest przebieg z okresami zaostrzeń i remisji (1, 2).

Wśród NChZJ wyodrębniono dwie główne i zarazem najczęstsze postaci choroby: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) oraz chorobę Leśniowskiego - Crohna (ChLC). Około 10-15% pacjentów z NChZJ nie można jednoznacznie przyporządkować do żadnej z powyższych grup i przypadki te kwalifikowane są jako nieokreślone zapalenie okrężnicy (2-4). Ponadto, do NChZJ zaliczamy też niektóre rzadziej występujące jednostki chorobowe, takie jak: mikroskopowe zapalenie jelit, eozynofilowe zapalenie jelit, kolagenowe zapalenie jelita grubego.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest stanem zapalnym błony śluzowej okrężnicy, który może występować pod postacią przekrwienia, obrzęku, nadżerek, a w cięższych postaciach prowadzi do powstawania charakterystycznych owrzodzeń. Zmiany zapalne w przebiegu WZJG ograniczone są do błony śluzowej i podśluzowej okrężnicy, nie obejmują głębszych warstw ściany jelita. Proces chorobowy rozpoczyna się w odbytnicy i szerzy się przez ciągłość w kierunku proksymalnym jelita grubego, nie wykraczając poza obręb okrężnicy (5-7).

Zmiany zapalne w chorobie Leśniowskiego - Crohna mogą występować na każdym odcinku przewodu pokarmowego, od jamy ustnej aż do odbytu. Schorzenie to opisywane jest jako odcinkowe zapalenie, ponieważ zmienione chorobowo partie przewodu pokarmowego poprzedzielane są odcinkami zdrowymi. Najczęstszą lokalizacją zmian chorobowych jest końcowy odcinek jelita krętego. Ponadto w ChLC

charakterystyczne jest zapalenie pełnościenne, czyli takie, które nie ogranicza się do błony śluzowej, lecz penetruje do głębszych warstw ściany przewodu pokarmowego. Skutkuje to powstawaniem zwężeń w obrębie światła jelita oraz formowaniem przetok (6-8).

1.1.2. Epidemiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit to schorzenia występujące na całym świecie, obserwuje się jednak pewne różnice w zależności od regionu geograficznego, stopnia industrializacji danego obszaru, a także pochodzenia rasowego czy etnicznego danej populacji. Najwyższą zapadalność na te choroby obserwuje się w krajach Europy oraz Ameryki Północnej. Znacznie mniej przypadków NChZJ odnotowuje się w krajach Afryki, Azji i Ameryki Południowej (9-13).

Choroby te występują przede wszystkim w krajach wysoko rozwiniętych i uprzemysłowionych, częściej też dotyczą obszary wielkomiejskie niż wiejskie. Jednakże, w ostatnich latach obserwuje się również stopniowy wzrost zapadalności na te choroby w krajach rozwijających się, równoległe ze wzrostem poziomu życia i rozwojem przemysłu oraz urbanizacji w tych regionach. Wskazuje to na związek NChZJ z czynnikami środowiskowymi (9, 10, 14).

Na całym świecie rokrocznie odnotowuje się zwiększenie zachorowalności na NChZJ, zarówno wśród dorosłych, jak i dzieci (15, 16).

W Europie, w zależności od regionu, zapadalność na WZJG wynosi od 0,9/100 000 osób/rok do 24/100 000 osób/ rok. Częstość występowania WZJG waha się natomiast od 2,4 do 294 osób/ 100 000 mieszkańców i jest wyższa w północnej oraz zachodniej części kontynentu niż w krajach położonych na południu i na wschodzie Europy (17-20). W Ameryce Północnej zapadalność na WZJG wynosi od 2,2/100 000 osób/rok do 14,3/100 000 osób/rok. Częstość występowania tej choroby jest tam również wyższa niż w Europie i waha się od 37 do 246 osób/ 100 000 mieszkańców (9, 11).

ChLC jest rzadziej występującą jednostką chorobową niż WZJG. W populacji europejskiej zapadalność wynosi od 0,8/100 000 osób/rok do 11,5/100 000 osób/rok. Częstość występowania choroby w Europie waha się od 1,5 do 213 osób/100 000 mieszkańców i jest wyższa przede wszystkim w północnej części kontynentu (18, 19, 21). W krajach Ameryki Północnej natomiast zapadalność na ChLC wynosi od 3,1/100 000 osób/rok do 14,6/100 000 osób na rok. Częstość występowania tej choroby w Ameryce Północnej również przewyższa kraje europejskie i wynosi od 26 do 199 przypadków/100 000 mieszkańców (9, 11).

Nadal brakuje dokładnych danych opisujących sytuację epidemiologiczną NChZJ w Polsce (22, 23). Jedyne opublikowane badania prospektywne dotyczą populacji pediatrycznej. Karolewska-Bochenek i wsp. (24) w badaniach przeprowadzonych w latach 2002-2004 wykazali zapadalność na NChZJ wśród polskich dzieci wynoszącą 2,7/100 000 dzieci/rok. Zapadalność na WZJG wynosiła 1,3/100 000/rok, a na ChLC 0,6/100 000/rok. Jakubowski i wsp. (22) natomiast przeprowadzili badania retrospektywne dotyczące hospitalizacji pacjentów z powodu NChZJ w Polsce, w latach 1991-1996 oraz 2003-2007, we wszystkich grupach wiekowych. Wykazali oni wzrost częstości hospitalizacji z powodu NChZJ wśród populacji ogólnopolskiej z 12,5/100 000 do 30,61/100 000, przy czym wzrost częstości hospitalizacji z powodu WZJG wynosił z 8,97/100 000 do 21,26/100 000, natomiast z powodu ChLC z 3,53/100 000 do 9,35/100 000. Na podstawie tych analiz można wnioskować, że problem NChZJ jest coraz powszechniejszy w naszym kraju (22).

NChZJ mogą ujawnić się w każdym wieku, jednak najczęściej pierwsze objawy obserwuje się u młodych dorosłych. Szczyt zachorowań na WZJG przypada między 30. a 40. rokiem życia, natomiast na ChLC między 15. a 30. rokiem życia (13, 14, 25)

Częstość występowania NChZJ jest zbliżona u obydwu płci. Większość badań wykazuje jednak, że zapadalność na WZJG jest nieco wyższa u mężczyzn, natomiast na ChLC nieznacznie częściej chorują kobiety (13, 25, 26).

1.1.3. Patogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit

Etiopatogeneza NChZJ jest złożona i nie do końca poznana. Przyjmuje się, że u podłoża tych chorób leżą uwarunkowania genetyczne, procesy immunologiczne i liczne czynniki środowiskowe (w tym także środowisko wewnętrzne przewodu pokarmowego, zwane mikrobiotą jelitową).

NChZJ to choroby występujące rodzinnie, co sugeruje udział czynników genetycznych w ich powstawaniu. Przeprowadzone analizy wykazały, że u pacjentów z NChZJ ryzyko choroby u krewnych pierwszego stopnia wynosi ok. 10%, natomiast jeśli obydwój z rodziców chorują na NChZJ, ryzyko zachorowania wynosi 36% dla każdego dziecka. W badaniach wśród par bliźniąt jednojajowych wykazano zgodność występowania ChLC rzędu 58%, natomiast w przypadku WZJG tylko 6%. Udowodniono też związek niektórych genów z występowaniem bądź przebiegiem NChZJ. Wykazano, że mutacje prowadzące do utraty funkcji genu CARD15 na chromosomie 16 mogą odpowiadać za ok. 10% ryzyka wystąpienia ChLC. Ponadto, homozygotyczność tej mutacji powoduje aż 40-krotny wzrost ryzyka ChLC z obecnością zwężeń (27). Wiele badań podkreśla również związek występowania wariantu mutacji NOD2/CARD15 z cięższym przebiegiem ChLC oraz wyższą częstością występowania objawów pozajelitowych u tych chorych (28-30). Badanie przeprowadzone przez Andersona i wsp. (31) wykazało obecność aż 47 loci genowych mających związek z występowaniem WZJG, których 20 wykazuje związek również z występowaniem ChLC. Franke i wsp. (32) natomiast przeprowadzili ogromną metaanalizę, która podaje obecność 71 loci genowych związanych z występowaniem bądź przebiegiem ChLC.

Udział czynników immunologicznych w patogenezie NChZJ jest podkreślany od lat, a wiedza na ten temat jest stale uaktualniana. Obecnie wiadomo, że zarówno w przypadku WZJG jak i ChLC mamy do czynienia ze z nieprawidłowym oddziaływaniem limfocytów T CD4+, które u zdrowego człowieka hamują procesy zapalne w jelitach, uwalniając cytokiny hamujące, takie jak IL-10 czy TGF β . Zaburzone uwalnianie tychże cytokin u osób chorych może prowadzić do niekontrolowanego zapalenia jelita (27, 33, 34). Wykazano także udział komórek Th1 w patogenezie ChLC. Odpowiedzialne są

one za produkcję cytokin prozapalnych: IL-12 oraz IFN- γ , które powodują naciek ścian jelita przez komórki zapalne. W przypadku WZJG natomiast potwierdzono wzmożoną aktywność komórek T typu NK, które syntetyzują cytokiny prozapalne IL-13 (35-37). Ważnym mediatorem zapalnym o udowodnionej roli w patogenezie NChZJ jest czynnik martwicy nowotworów: TNF- α , którego poziom jest podwyższony we krwi i błonie śluzowej osób chorych (37). Odkrycie tego zjawiska pozwoliło zaprojektować leki wymierzone przeciwko temu czynnikowi, tzw. anty-TNF- α , do których należą powszechnie stosowane w terapii NChZJ przeciwciała monoklonalne: infliksimab czy adalimumab. Liczne mechanizmy immunologiczne odpowiedzialne za stan zapalny w NChZJ nie zostały jeszcze wyjaśnione i pozostają przedmiotem badań.

Czynniki środowiskowe stanowią ogromną i różnorodną grupę, która odgrywa bardzo istotną rolę w patogenezie NChZJ. Obejmują one: styl życia, przebyte choroby, narażenie na substancje szkodliwe, przyjmowane leki, a także zmiany w mikrobiocie jelitowej.

Wielu badaczy podnosi rolę diety jako ważnego czynnika w etiopatogenezie NChZJ. Udowodniono, że tzw. „dieta zachodnia”, powszechna w krajach rozwiniętych, która obfituje w produkty wysoko przetworzone, cukier rafinowany, białka i tłuszcze zwierzęce, sprzyja rozwojowi NChZJ. W latach 70tych prace przeprowadzone przez dwie grupy badaczy: Martini i wsp. (38) oraz Mayberry i wsp. (39) wykazały, że osoby, które zachorowały na ChLC spożywały znacznie częściej cukry rafinowane. Późniejsze badania potwierdziły bezpośredni związek spożycia sacharozy z ryzykiem występowania NChZJ. Podkreśla się tu szczególnie niekorzystny wpływ gotowych słodzonych napojów, słodczy i deserów przemysłowych (40-42). Wykazano także związek między zwiększonym spożyciem mięsa a rozwojem NChZJ oraz częstszym występowaniem zaostrzeń choroby wśród osób spożywających regularnie mięso (43-45). Jowett i wsp. (44) w swoim badaniu prospektywnym wykazali związek pomiędzy spożyciem mięsa a wyższą częstością zaostrzeń WZJG. W przypadku mięsa czerwonego i przetworzonego, dodatnia korelacja z częstością zaostrzeń było jeszcze wyraźniej zaznaczona. Spożycie ryb natomiast wykazuje negatywną korelację z ryzykiem zachorowania na ChLC (46). Wiele badań potwierdza, że dieta z dużą

zawartością błonnika roślinnego, przede wszystkim w postaci świeżych owoców i warzyw, wykazuje działanie ochronne przed zachorowaniem na NChZJ (42, 46-48). Russel i wsp. (42) w swoim badaniu udowodnili, że regularne spożycie cytrusów istotnie zmniejsza ryzyko zachorowania na ChLC. Podkreśla się także wpływ diety bogatotłuszczowej na nasilenie procesów zapalnych odpowiadających za NChZJ. Naukowcy są zdania, że nadmiar tłuszczu w diecie powoduje istotne zmiany w mikrobiomie jelitowym, które wywołują procesy zapalne. Wiele przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazuje również, że spożywanie wielonienasyconych kwasów omega-6, a w szczególności kwasu arachidonowego i linolenowego to istotny czynnik biorący udział w patogenezie NChZJ (49-51). Działanie ochronne na błonę śluzową jelit wykazano natomiast dla wielonienasyconych kwasów omega-3, których regularne przyjmowanie w diecie może zmniejszać ryzyko zachorowania na WZJG (52, 53).

Wpływ palenia papierosów na rozwój i przebieg NChZJ jest tematem od lat budzącym kontrowersje. Wiele przeprowadzonych badań potwierdza ścisły związek palenia tytoniu ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ChLC oraz cięższym przebiegiem tej choroby wśród palaczy (41, 54, 55). Jednocześnie udowodniono odwrotne działanie w przypadku WZJG. Wiele badań potwierdziło, że palenie tytoniu nie tylko zmniejsza ryzyko zachorowania na WZJG, a także odpowiada za łagodniejszy przebieg choroby u palaczy z rozpoznaniem WZJG (41, 54-57). Ponadto, nagłe zaprzestanie palenia niejednokrotnie wywołuje pierwszą w życiu manifestację WZJG. Często obserwuje się również nagłe zaostrzenie choroby u osób palących i chorujących na WZJG, którzy w czasie trwania choroby rzucili palenie. Analogicznie, obserwuje się poprawę stanu klinicznego u byłych palaczy chorujących na WZJG, którzy wrócili do palenia (54, 58). Mechanizm tego zjawiska nie został do końca zbadany. Niektórzy badacze są zdania, że nagłe zaprzestanie palenia powoduje zbyt gwałtowne zmiany w mikrobiocie jelitowej, które odpowiadają za ujawnienie się bądź zaostrzenie WZJG (55, 59).

W wielu pracach podkreśla się rolę czynników infekcyjnych w etiopatogenezie NChZJ. Badania wykazały, że bakterie z rodzaju *Listeria*, *Escherichia*, *Campylobacter*,

Salmonella, *Yersinia*, *Clostridium* i *Mycobacterium* mogą uszkadzać błonę śluzową jelita, a także zmieniać skład flory jelitowej, przyczyniając się jednocześnie do zwiększenia ryzyka zachorowania na NChZJ (60-63). Badanie przeprowadzone przez Wurzelmann i wsp. (64) wykazało, że pacjenci z WZJG i ChLC przebyli więcej infekcji w dzieciństwie niż osoby z grupy kontrolnej. Najczęściej infekcje te dotyczyły zapalenia gardła i ucha.

Liczne badania zwracają również uwagę na wpływ usunięcia wyrostka robaczkowego na ryzyko zachorowania na NChZJ. Temat ten, podobnie jak wpływ palenia papierosów, budzi spore kontrowersje. Większość prac dowodzi, że przebyte *appendectomy* zwiększa ryzyko zachorowania na ChLC przede wszystkim w pierwszym roku po zabiegu, natomiast po upływie pięciu i więcej lat nie zaobserwowano takiej prawidłowości. Zostało to przedstawione w metaanalizie przeprowadzonej przez Kaplana i wsp. (65). Przebyte usunięcie wyrostka robaczkowego wykazuje natomiast negatywną korelację z ryzykiem zachorowania na WZJG. Wiele badań potwierdza także korzystny wpływ tego zabiegu na przebieg choroby u pacjentów z rozpoznaniem WZJG. Podkreśla się zarówno związek przebytej *appendektomii* z łagodniejszym przebiegiem choroby, jak i ze zmniejszeniem częstości zaostrzeń oraz u większości pacjentów pozwala uniknąć resekcji jelita grubego (57, 66, 67). Niektórzy badacze są jednak zdania, że przede wszystkim przebyte zapalenie wyrostka robaczkowego chroni przed zachorowaniem na WZJG, a nie zabieg jego usunięcia (68, 69).

Wiele prac dotyczy wpływu stosowanych leków na ryzyko zachorowania oraz ciężkość przebiegu NChZJ. Przeprowadzone badania dowodzą, że przewlekłe przyjmowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zwiększa ryzyko zachorowania na ChLC oraz WZJG, a także pogarsza przebieg tych chorób (70-74). Podkreśla się również związek pomiędzy przyjmowaniem doustnych leków antykoncepcyjnych a ryzykiem zachorowania na NChZJ (75-78). Liczne prace dotyczą także wpływu stosowania antybiotyków na zwiększone ryzyko NChZJ. Zjawisko to zaobserwowano przede wszystkim w przypadku wczesnej ekspozycji na antybiotykoterapię, tj. w wieku dziecięcym. Większość badaczy jest zdania, że wynika

to z niekorzystnego wpływu leków przeciwbakteryjnych na florę jelitową, co prowadzi do aktywacji procesów zapalnych i może przyczynić się do rozwoju NChZJ. Częściej opisuje się jednak zwiększone ryzyko zachorowania na ChLC niż na WZJG u osób narażonych na antybiotyki w dzieciństwie (79-82).

Zwraca się również uwagę na wpływ czynników psychogennych na rozwój oraz przebieg NChZJ. Wiele badań i opracowań podkreśla rolę stresu emocjonalnego, zaburzeń depresyjnych i zaburzeń snu w patogenezie tych chorób (27, 83-86). Na przebieg tych chorób wpływają często ważne wydarzenia życiowe wiążące się z dużym ładunkiem emocjonalnym, jak np. takie jak śmierć bliskiej osoby, rozwód, egzamin maturalny czy zmiana pracy. Niejednokrotnie wywołują one zaostrzenie choroby, a czasem także są „mechanizmem spustowym”, powodującym pierwsze ujawnienie się NChZJ. Uważa się, że stres indukuje produkcję cytokin prozapalnych, wpływa niekorzystnie na skład mikroflory jelitowej i zwiększa przepuszczalność jelit. W wielu pracach podkreśla się również, że deprivacja snu dodatkowo przyczynia się do nadmiernego uwalniania cytokin prozapalnych, co często nasila objawy NChZJ (27, 85-87). Wieloośrodkowe badanie przeprowadzone przez Ananthakrishnan i wsp. (88) wykazało natomiast, że pacjenci z ChLC, u których rozpoznano zaburzenia depresyjne lub lękowe, znacznie częściej musieli być poddawani zabiegom chirurgicznym.

1.1.4. Objawy kliniczne nieswoistych chorób zapalnych jelit

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Najważniejszym objawem zgłaszanym przez pacjentów z WZJG jest obecność krwawienia z dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Może występować pod postacią krwistej biegunki, krwawienia z odbytu lub obecności domieszki krwi w stolcu. Ponadto u chorych tych często występują wypróżnienia z domieszką śluzu. Kolejnym objawem są kurczowe bóle brzucha często związane z rytmem wypróżnień: typowe jest tu bolesne, nagłe parcie na stolec, które występuje również w nocy i niejednokrotnie powoduje przerwanie snu. Dolegliwości mogą się różnić w zależności

od lokalizacji choroby. Pacjenci z zapaleniem odbytnicy wydalają świeżą krew lub podbarwiony krwią śluz zmieszany ze stolcem lub pokrywający powierzchnię stolca. Zapalenie zlokalizowane w odbytnicy lub odbytnicy i esicy często powoduje zwolnienie pasażu jelitowego, a chorzy ci mogą zgłaszać zaparcia lub bolesne parcie na stolec z niepełnym wypróżnieniem. U pacjentów ze zmianami zapalnymi dochodzącymi do bardziej proksymalnych części jelita, następuje przyspieszenie pasażu jelitowego i częściej pojawia się krwista biegunka (27). W przypadku choroby o ciężkim przebiegu typowe są płynne stolce z domieszką krwi i ropy, z towarzyszącym kurczowym bólem brzucha. WZJG jest chorobą przebiegającą z okresami zaostrzeń i remisji. Do objawów ogólnych, sugerujących zaostrzenie choroby należą: gorączka, ogólne osłabienie, tachykardia, utrata masy ciała oraz zwiększona częstotliwość krwistych wypróżnień (5).

Na potrzeby dokładniejszej oceny aktywności WZJG powstała wprowadzona w 2006 roku klasyfikacja montrealaska. W zależności od objawów choroby, pozwala ona zaklasyfikować pacjentów do jednej z czterech grup (S0-S3). Pacjentów bezobjawowych zalicza się do grupy S0, która oznacza remisję. Grupy S1, S2 i S3 reprezentowane są odpowiednio przez pacjentów z łagodnym, średnio-ciężkim oraz ciężkim rzutem choroby (6, 89). Klasyfikacja ta została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska aktywności WZJG (6, 89).

Aktywność WZJG		Kryteria
S0	Remisja kliniczna	Brak objawów
S1	Łagodny rzut choroby	≤ 4 stolce na dobę z krwią lub bez, brak objawów ogólnoustrojowych, prawidłowa wartość OB
S2	Średnio ciężki rzut choroby	> 4 stolce na dobę z obecnością krwi, minimalne objawy ogólnoustrojowe

S3	Ciężki rzut choroby	> 6 stolców na dobę z obecnością krwi, Objawy ogólnoustrojowe: HR >90/min, OB>30/h, temp.>37,5°C, Hgb<10,5 g/dl
-----------	---------------------	---

HR – częstość pracy serca, OB – odczyn Biernackiego, temp. – temperatura ciała, Hgb-hemoglobina

WZJG może prowadzić do powikłań, które pojawiają się najczęściej podczas ciężkich zaostrzeń. U 1% pacjentów dochodzi do masywnego krwotoku z jelita, który wywołuje ostrą niedokrwistość i wymaga pilnej transfuzji preparatów krwiopochodnych. Jednym z najpoważniejszych powikłań WZJG jest toksyczne rozdęcie okrężnicy (*megacolon toxicum*), będące stanem zagrożenia życia. Definiowane jest jako poszerzenie światła jelita powyżej 5-6 cm z zanikiem haustracji i występuje u ok. 5% chorych, w połowie przypadków wymaga kolektomii. Groźnym powikłaniem jest również perforacja jelita grubego. U 5-10% pacjentów z WZJG dochodzi do zwężeń. Mogą być one skutkiem zapalenia i włóknienia, ale niekiedy są objawem rozwijającego się nowotworu. Sporadycznie wśród chorych z WZJG powstają również zmiany okołodbytowe w postaci szczeliny odbytu, żylaków czy ropni (27, 90).

Choroba Leśniowskiego - Crohna

Obraz kliniczny ChLC zależy od lokalizacji i rozległości zmian zapalnych oraz postaci klinicznej choroby. W 80% przypadków zmianami zapalnymi objęte jest jelito cienkie, a najczęściej jest to jego dystalna część (*ileum terminale*). 25-30% pacjentów ma zmiany ograniczone do jelita cienkiego, 20%- do jelita grubego, natomiast 40-50% prezentuje obecność choroby zarówno w jelicie cienkim jak i grubym. Znacznie rzadziej zmiany typowe dla ChLC stwierdza się w przełyku, żołądku lub dwunastnicy (0,5-13% chorych). Powszechne w tej chorobie jest występowanie zmian okołodbytowych, które stwierdza się u 35-45% pacjentów z ChLC (23).

Biorąc pod uwagę fakt, że najczęstszą lokalizacją zmian zapalnych w ChLC jest końcowy odcinek jelita krętego, dominującym objawem choroby jest ból brzucha

lokalizujący się typowo w prawym dole biodrowym. Niekiedy początek choroby imituje ostre zapalenie wyrostka robaczkowego, z ostrym bólem brzucha, gorączką, palpacyjnie wyczuwalnym guzem w prawym dolnym kwadrancie jamy brzusznej. Częstym objawem ChLC jest również wodnista biegunka, rzadko z obecnością krwi. Spowodowana jest głównie zwiększonym wydzielaniem wody i elektrolitów przez zmienione zapalnie jelito oraz upośledzenie wchłaniania. Rzadko, w przypadku zwężających zmian w jelicie krętym, ChLC może przebiegać z zaparciami. Podobnie jak WZJG, ChLC również przebiega z okresami zaostrzeń i remisji. Chorobie towarzyszy cały szereg objawów ogólnych, które nasilają się podczas zaostrzeń. Należą do nich: osłabienie, utrata apetytu, stan podgorączkowy lub gorączka, spadek masy ciała. Wysoka gorączka często zwiastuje tworzenie się ropnia wewnątrzbrzusznego (23, 27). Typową cechą ChLC jest tendencja do tworzenia przetok, czyli patologicznych połączeń między zajęłą chorobowo częścią przewodu pokarmowego a strukturami sąsiednimi. W zależności od lokalizacji, mogą powstawać np. przetoki jelitowo-jelitowe, jelitowo-skórne, jelitowo-pęcherzowych, jelitowo-pochwowe, okołodbytnicze, czy rzadziej: jelitowo-żołądkowe. Prowadzi to do patologicznego przedostania się treści pokarmowej poza światło przewodu pokarmowego lub do innej jego części, powodując szereg komplikacji (7, 23, 27).

Znaczne zróżnicowanie obrazu klinicznego ChLC stworzyło potrzebę opracowania systemu klasyfikacji choroby, co zaowocowało powstaniem klasyfikacji montrealskiej ChLC. Uwzględnia ona: wiek w momencie rozpoznania choroby, lokalizację oraz przebieg kliniczny (6, 23, 89). Szczegółowo klasyfikację przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Klasyfikacja montrealaska ChLC (6, 23, 89).

Czynnik	Klasyfikacja montrealaska
Wiek w momencie rozpoznania	A1 ≤ 16. roku życia A2 17 – 40. rok życia A3 > 40 roku życia

Lokalizacja	L1 – końcowy odcinek jelita krętego L2 – okrężnica L3 – końcowy odcinek jelita krętego i okrężnica
Przebieg kliniczny	B1 – postać zapalna B2 – postać zwężająca B3 – postać drążąca p – zmiany okołodbytowe

W celu monitorowania aktywności ChLC stosuje się wskaźnik CDAI (ang. *Crohn's disease activity index*). Uwzględnia on liczbę luźnych stolców, występowanie bólu brzucha oraz samopoczucie chorego w ciągu ostatnich siedmiu dni, a także konieczność stosowania leków przeciwbiegunkowych, występowanie objawów pozajelitowych i powikłań, obecność guza w jamie brzusznej, wartość hematokrytu oraz masę ciała (6, 23). Sposób obliczania CDAI przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Obliczanie wskaźnika aktywności ChLC (CDAI). Na podstawie: (6, 23).

1. Liczba luźnych stolców / tydzień	Suma x2
2. Bóle brzucha w skali 0-3 / tydzień	Suma x5
3. Samopoczucie w skali 0-4 / tydzień	Suma x7
4. Objawy pozajelitowe i powikłania: 0- brak, 1- za każdy	Suma x20
5. Konieczność stosowania leków przeciwbiegunkowych: 0-nie, 1-tak	x30
6. Guz w jamie brzusznej: 0-nie, 1-wątpliwy, 5- tak	x10
7. Hematokryt (Ht): kobiety: 42-Ht, mężczyźni: 47-Ht	x6
8. Masa ciała: % poniżej masy należnej	x1
Suma: < 150: remisja, 150-220: mała aktywność, >220-450: średnia aktywność, >450: duża aktywność	

Podobnie jak WZJG, ChLC może również prowadzić do powikłań. U 10-30% chorych dochodzi do tworzenia ropni wewnątrz jamy brzusznej i miednicy. Ryzyko ich powstawania rośnie w przypadku systemowego stosowania glikokortykosteroidów. Ponadto w ChLC z uwagi na obecność zwężeń dochodzić może do podniedrożności lub niedrożności jelit. Do innych częstych powikłań należy ciężka choroba okołodbytowa. Z uwagi na obecność przetok w ChLC, ryzyko otwartej perforacji u tych chorych jest mniejsze niż w przypadku WZJG i dotyczy 1-2% pacjentów z ChLC (27).

Objawy pozajelitowe nieswoistych chorób zapalnych jelit

NChZJ zalicza się do chorób układowych, ponieważ u wielu chorych występują objawy pozajelitowe, czyli takie, które towarzyszą chorobie podstawowej, ale nie są związane ze światłem przewodu pokarmowego. Wyróżnia się m.in. manifestacje skórne, stawowe, oczne. Jednym z najczęstszych objawów skórnych towarzyszącym NChZJ jest rumień guzowaty, występujący u ok. 15% pacjentów z ChLC i 10% z WZJG. Jest to bolesne i ucieplone koliste zaczerwienienie skóry, zlokalizowane przeważnie na kończynach. Rumień guzowaty często koreluje z nasileniem choroby. Wśród innych manifestacji dermatologicznych NChZJ wyróżnia się zgorzelinowe zapalenie skóry, przewlekłą piodermię brodawkową oraz okołodbytowe wyrośla skórne. Ponadto, u 15-20% chorych z NChZJ występuje zapalenie stawów obwodowych, które jest bardziej wyrażone w okresach zaostrzeń choroby. Zajmuje w sposób asymetryczny przede wszystkim duże stawy kończyn. Uważa się, że ok. 10% pacjentów z NChZJ cierpi na zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZSSK). Inną manifestacją ze strony układu kostno-stawowego jest zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych. Objawy oczne dotyczą do 10% pacjentów z NChZJ. Najczęściej jest to zapalenie spojówek, błony naczyniowej oka, tęczówki, nadtwardówki i twardówki oka. Wykazano, że około połowa chorych na NChZJ prezentuje stłuszczenie wątroby. Około 1-5% pacjentów z NChZJ choruje na pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC- ang. *primary sclerosing cholangitis*), a 50-75% pacjentów z PSC choruje na NChZJ. Objawem, który często towarzyszy NChZJ jest również kamica żółciowa, która dotyka przede wszystkim pacjentów z ChLC z zapaleniem jelita

krętego lub po resekcji tej części jelita. Chorzy z rozpoznaniem ChLC z zajęciem jelita krętego predysponowani są również do kamicy moczowej. Istotnym klinicznie objawem towarzyszącym NChZJ jest również zwiększona krzepliwość krwi. Należy zatem pamiętać o podwyższonym ryzyku występowania zakrzepicy żyłnej i tętniczej wśród tych chorych (1, 27).

1.1.5 Diagnostyka nieswoistych chorób zapalnych jelit

Zarówno w przypadku WZJG jak i ChLC nie dysponujemy „złotym standardem” diagnostycznym, czyli jednym prostym badaniem umożliwiającym pewne rozpoznanie choroby. Diagnoza stawiana jest na podstawie całości obrazu klinicznego, badań laboratoryjnych, obrazowych, endoskopowych oraz histopatologicznych (5, 8).

Badania endoskopowe

Bardzo ważnym elementem w procesie diagnostycznym NChZJ są badania endoskopowe połączone z oceną histopatologiczną wycinków pobranych z błony śluzowej przewodu pokarmowego. Badania te są również istotne dla monitorowania przebiegu choroby oraz profilaktyki raka jelita grubego rozwijającego się na podłożu NChZJ. Kolonoskopia umożliwia ocenę całego jelita grubego, zastawki Bauhina oraz dystalnego odcinka jelita krętego. Często obraz makroskopowy błony śluzowej jelita pozwala z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić podejrzenie kliniczne, jednakże badanie to musi zawsze zostać poparte oceną histopatologiczną. Dość powszechnym badaniem wykorzystywanym w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu WZJG jest fiberosigmoidoskopia, czyli kolonoskopia ograniczona do dystalnej części jelita, ponieważ tam najczęściej lokalizują się zmiany typowe dla tej choroby. W przypadku podejrzenia ChLC konieczne jest również wykonanie gastroskopii, celem wykluczenia zmian w górnym odcinku przewodu pokarmowego. Niekiedy wskazane jest również wykonanie enteroskopii- badanie to umożliwia ocenę większej części jelita cienkiego. Do technik endoskopowych zaliczamy również endoskopię kapsułkową, która

pozwała na uwidocznienie błony śluzowej jelita cienkiego na całej długości, nie daje jednak możliwości pobrania wycinków do badań histopatologicznych (6, 7).

Zmiany zapalne w przebiegu WZJG rozpoczynają się w odbytnicy i szerzą się proksymalnie w sposób ciągły, bez fragmentów niezmienionej błony śluzowej pomiędzy nimi. Mogą ograniczać się do kątnicy lub postępować dalej, obejmując niekiedy całe jelito grube. Granica aktywnych zmian chorobowych jest przeważnie widoczna makroskopowo podczas kolonoskopii. Rozległość zmian zapalnych towarzyszących WZJG pomaga określić klasyfikacja montreala która wyróżnia wrzodziejące zapalenie odbytnicy, lewostronne zapalenie okrężnicy oraz rozległe zapalenie jelita grubego, w tym *pancolitis* (6, 89). Przedstawiono ją w tabeli 4.

Tabela 4. Klasyfikacja montreala zasięgu zmian WZJG (6, 89).

Zasięg choroby		Lokalizacja
E1	Wrzodziejące zapalenie odbytnicy (<i>proctitis</i>)	Zmiany ograniczone do odbytnicy (nie przekraczają zagięcia odbytniczno-esciczego)
E2	Lewostronne zapalenie jelita grubego	Zmiany występują dystalnie do zagięcia śledzionowego
E3	Rozległe zapalenie jelita grubego	Zmiany występują proksymalnie do zagięcia śledzionowego, mogą obejmować całe jelito grube (<i>pancolitis</i>)

Obraz endoskopowy WZJG zależy od nasilenia choroby. W okresach remisji błona śluzowa jelita często nie wykazuje widocznych makroskopowo zmian. Podczas zapalenia o niewielkiej aktywności obserwuje się zaczerwienienie błony śluzowej z granulowaną powierzchnią oraz nieco gorzej widoczny, „zatarty” rysunek naczyń. W miarę nasilania się stanu zapalnego siatka naczyń staje się niewidoczna, a pojawiają się nadżerki, obrzęk i przekrwienie błony śluzowej oraz tendencja do krwawień- charakterystyczne jest krwawienie kontaktowe podczas manipulacji endoskopem. Ciężki stan zapalny cechuje obecność owrzodzeń

otoczonych zmienioną zapalnie błoną śluzową. W świetle jelita obecna jest krew i ropa oraz występuje krwawienie spontaniczne, niewywołane urazem. W przypadku WZJG o długim obserwuje się zanik haustracji i obecność polipów zapalnych (5-7, 90).

Cechą charakterystyczną zmian zapalnych w obrazie endoskopowym ChLC jest brak ciągłości. W odróżnieniu od WZJG, odcinki jelita zmienione chorobowo poprzedzielane są prawidłową błoną śluzową, co jest widoczne również makroskopowo. Zmiany chorobowe mogą pojawić się w każdym odcinku przewodu pokarmowego, ale najczęściej lokalizują się w dystalnej części jelita krętego i prowadzą do zwężenia okolicy zastawki krętniczo-kątniczej. Nieodzownym elementem diagnostyki ChLC jest pobranie wycinków z tej okolicy (6-8).

Zmiany typowe dla ChLC to owrzodzenia i nadżerki, które mają kształt linijny, szczelinowaty i zazwyczaj są głębokie – przechodzą do głębszych warstw jelita i mogą zająć całą jego ścianę. Często dochodzi też do zwężeń światła przewodu pokarmowego oraz tworzenia przetok. W obrazie endoskopowym widoczne jest również miejscowe przekrwienie i obrzęk. Błona śluzowa jelita poprzecinana owrzodzeniami oraz uniesiona przez naciek zapalny daje charakterystyczny dla tej choroby obraz tzw. „kostki brukowej” (6, 7).

Badanie histopatologiczne

Obraz histopatologiczny zmian w przebiegu WZJG zależy od fazy choroby. Podczas zaostrzenia procesu chorobowego obserwuje się nierówną powierzchnię błony śluzowej oraz przerwanie ciągłości nabłonka w miejscach owrzodzeń. W blaszce właściwej błony śluzowej obecne są nacieki zapalne ze zwiększoną liczbą limfocytów i plazmocytów oraz ogniskowe nacieki granulocytarne. W kryptach widoczne są ropnie, a zmniejszeniu ulega ilość komórek kubkowych produkujących śluz. W fazie gojenia zmian zapalnych zmniejszeniu ulega ilość limfocytów i plazmocytów, ustępują nacieki granulocytarne, a zwiększa się liczba komórek kubkowych. Przywróceniu ulega ciągłość nabłonka. W okresie remisji widoczne jest skrócenie krypt oraz odsunięcie ich dna od blaszki mięśniowej. W dnie krypt pojawiają się komórki Panetha. Obserwuje się też zaburzenie architektury krypt:

utrata równoległości rozgałęzianie się, zwężanie światła. Można również stwierdzić zanik błony śluzowej (6, 90)

Badanie histopatologiczne w chorobie Leśniowskiego-Crohna wykazuje stan zapalny na całej grubości ściany jelita, nie tylko w obrębie błony śluzowej. Zbudowany jest głównie z komórek jednojądrowych. Często udaje się uwidocznienie nieserowaciejące ziarniniaki, które nie są spotykane w WZJG. Wczesnym objawem są owrzodzenia aftowe, będące drobnymi ogniskami martwicy. Zaznaczona jest również odcinkowość zmian i w obrazie mikroskopowym obecne są również fragmenty prawidłowego jelita. W obrazie histopatologicznym ChLC występują też głębokie, szczelinowate owrzodzenia przypominające nacięcia nożem. Ich światło jest wąskie, a brzegi pokryte są ziarniną (6, 90-92).

Badania obrazowe

Najstarszym i obecnie rzadziej stosowanym w diagnostyce NChZJ badaniem jest badanie rentgenowskie. Najwcześniejszą zmianą w badaniu radiologicznym z wlewem kontrastowym podawanym doodbytniczo u pacjenta WZJG jest charakterystyczne granulowanie błony śluzowej. W kolejnych stadiach choroby można uwidocznienie owrzodzenia, pogrubienie fałdów, a u pacjentów z wieloletnim przebiegiem choroby zaznaczony jest zanik haustracji jelita grubego oraz polipy mogące mieć charakter zapalny, utkanie gruczolaka lub raka. Radiogram przeglądowy jamy brzusznej na stojąco ma zastosowanie w szybkiej ocenie jelit, celem wykluczenia stanów zagrażających życiu. Pozwala rozpoznać toksyczne rozdęcie jelita grubego (*megacolon toxicum*) będące powikłaniem WZJG. Znajduje również zastosowanie w rozpoznaniu perforacji jelita. Ponadto, na podstawie widocznych pętli jelitowych z poziomami płynów, można zdiagnozować niedrożność lub podniedrożność przewodu pokarmowego, która może powstać na skutek zwężeń, przede wszystkim w przebiegu ChLC.

Badania z użyciem tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego znajdują zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce ChLC. Pozwalają uwidocznienie zmiany w obrębie jelita cienkiego, takie jak pogrubienie fałdów oraz aftopodobne

owrzodzenia, a w przypadku zaawansowanej choroby stwierdza się zwężenia jelit, przetoki, guzy zapalne i ropnie. Umożliwiają również wizualizację krezki jelita i węzłów chłonnych jamy brzusznej. Szczególnie pomocne są badania z użyciem środka kontrastowego oraz powodującego rozdęcie jelit celem ich lepszej wizualizacji: enterografia i enteroklyza. Różnica pomiędzy nimi polega na sposobie podania tego środka: w przypadku enterografii dostarczany jest doustnie, a podczas enteroklyzy zakładany jest w tym celu zgłębnik do jelita czczego. Metody te pozwalają w sposób dokładny uwidocznić budowę warstwową ściany jelita wraz z obecnymi zmianami zapalnymi w ich obrębie. Enterografia należy do preferowanych narzędzi diagnostycznych u chorych z podejrzeniem ChLC jelita cienkiego i powikłań w przebiegu tej choroby. Badanie z użyciem rezonansu magnetycznego jest jednak bezpieczniejsze ze względu na brak narażenia na promieniowanie, co ma znaczenie szczególnie u osób młodych, z perspektywą wielokrotnego powtarzania badań obrazowych celem oceny przebiegu choroby (6, 27, 93-96).

W ostatnich latach podkreśla się rosnącą rolę ultrasonografii w diagnostyce obrazowej jelit. Jest to metoda łatwo dostępna, nieinwazyjna oraz niedroga, a rozwój tej techniki daje coraz lepsze możliwości oceny struktur jelitowych. Podczas rutynowego badania ultrasonograficznego jamy brzusznej wykrywalne są takie nieprawidłowości jak rozdęcie jelita, pogrubienie jego ściany, powiększenie węzłów chłonnych jamy brzusznej, a także obecność ropni, przetok oraz płynu okołopętlowego. Głowica liniowa natomiast przeznaczona jest przede wszystkim do oceny jelit i pozwala z dużą dokładnością ocenić zasięg zmian zapalnych oraz zwizualizować poszczególne warstwy jelita. Celem poprawy jakości badania możliwe jest też zastosowanie środków kontrastowych podawanych doustnie, doodbytniczo oraz dożylnie. Badanie to znajduje zastosowanie w monitorowaniu przebiegu NChZJ, a także jako badanie alternatywne przy braku dostępności tomografii komputerowej czy rezonansu magnetycznego. Wiarygodność badania zależy jednak w dużej mierze od doświadczenia ultrasonografisty (96-100).

Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne są często wykorzystywane jako narzędzia pomocnicze w diagnostyce i monitorowaniu ciężkości przebiegu NChZJ. Wadą ich jest brak specyficzności dla danej jednostki chorobowej. Odczyn Biernackiego (OB) jest jednym z najstarszych i najtańszych badań laboratoryjnych używanych do oceny aktywności procesu zapalnego, w tym również w przebiegu NChZJ. Wskaźnik ten ilustruje przyspieszone opadanie krwinek czerwonych towarzyszące stanom zapalnym. Nieco nowszą metodą jest pomiar stężenia białka ostrej fazy, zwanego białkiem C-reaktywnym (ang. *C-reactive protein* = CRP) w surowicy krwi. CRP charakteryzuje wyższą czułość niż OB. Oba te wskaźniki dobrze korelują z aktywnością choroby i obrazem klinicznym. O aktywności stanu zapalnego świadczyć może również podwyższony poziom fibrynogenu, który jest innego rodzaju białkiem ostrej fazy. Należy jednak pamiętać o ich niskiej swoistości i innych czynnikach mogących wpływać na ich wartość, takich jak procesy zapalne toczące się niezależnie od choroby podstawowej. Ponadto chorobom tym często towarzyszy niedokrwistość spowodowana między innymi utratą krwi oraz zaburzeniami wchłaniania żelaza, stąd też w badaniach laboratoryjnych obserwuje się obniżony poziom krwinek czerwonych, hemoglobiny, hematokrytu oraz żelaza i ferrytyny. Poza anemią, w morfologii krwi obwodowej często stwierdzana jest leukocytoza i nadpłytkowość, które to parametry również świadczą o aktywności procesu zapalnego. Niedożywienie, zaburzenia wchłaniania i niedobór masy ciała prowadzą do niedoboru białka i spadku stężenia albumin w surowicy krwi (5-8).

Nieodzownym elementem diagnostyki różnicowej NChZJ z innymi schorzeniami jest badanie bakteriologiczne stolca, ponieważ wiele chorób infekcyjnych może przebiegać z obrazem klinicznym i endoskopowym zbliżonym do NChZJ. Próbkę kału powinna być zbadana pod kątem zakażeniem bakteriami z rodzaju *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* oraz *Clostridium difficile*. Warto również pamiętać, że do zakażenia tymi bakteriami może dojść również u pacjentów z rozpoznaną NChZJ. Badania te są więc również obowiązkowe u pacjentów z

ustalonym rozpoznaniem, u których występuje ciężki lub oporny na tradycyjne leczenie rzut choroby (6, 7, 27).

Oznaczanie swoistych przeciwciał w surowicy krwi może ułatwić różnicowanie WZJG z ChLC. Najdłużej stosowane w diagnostyce NChZJ są przeciwciała pANCA (przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych z okołojądrowym typem fluorescencji) oraz ASCA (przeciwciała przeciw *Saccharomyces cerevisiae*). Przeciwciała pANCA są wysoce swoiste dla WZJG i stwierdzane są u ok. 60-70% tych pacjentów, a jedynie u 5-10% chorujących na ChLC. Ich częstość występowania w populacji zdrowej wynosi natomiast 2-3%. Przeciwciała ASCA stwierdza się natomiast głównie u pacjentów z ChLC, obecne są one u 60-70% tychże chorych oraz u 10-15% pacjentów z WZJG, a także u 5% reprezentantów populacji kontrolnej. Kolejnym markerem serologicznym w diagnostyce różnicowej NChZJ są przeciwciała przeciwko części zewnątrzwydzielniczej trzustki (PAB), które są wysoce swoiste dla ChLC, ale ich czułość jest niewielka. Możliwe jest również oznaczanie przeciwciał przeciwko komórkom kubkowym jelita (GAB), które są bardziej swoiste dla WZJG. Są to przeciwciała skierowane bezpośrednio przeciwko mukopolisacharydom komórek kubkowych błony śluzowej jelita grubego. Wszystkie powyższe markery serologiczne, z uwagi na niską swoistość, pełnią jedynie rolę uzupełniającą w diagnostyce i różnicowaniu NChZJ (6, 27, 101, 102).

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się badaniom nad stężeniem kalprotektyny i laktoferyny w stolcu. Są to specyficzne białka zwane kopromarkerami. Kalprotektyna jest kompleksem białek wiążących wapń i cynk, wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe. Jest ona uwalniana przez leukocyty w odpowiedzi na proces zapalny, co prowadzi do wzrostu jej stężenia w płynach ciała oraz kale. Dodatkowo, w przebiegu NChZJ dochodzi do „rozszerzenia” bariery jelitowej i przenikania leukocytów przez ścianę jelita, powodując istotny wzrost stężenia kalprotektyny w kale. Badania dowodzą, że do wzrostu stężenia kalprotektyny w kale może dochodzić w przypadku takich stanów zapalnych jak: NChZJ, infekcje bakteryjne przewodu pokarmowego, nowotwory jelita grubego, a także choroby trzustki. Laktoferyna jest glikoproteiną, która pełni funkcje białka odpornościowego. Wykazuje

również działanie przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe. W odpowiedzi na stan zapalny dochodzi do degranulacji neutrofilii i uwalniania laktoferyny do krwi, moczu, kału, śliny i łez. Jej zaletą jest termostabilność i odporność na działanie enzymów trawiennych, dzięki czemu może być wykrywana w kale. Jej podwyższone stężenie w kale koreluje z aktywnością zmian zapalnych w jelicie. Badanie stężenia kopromarkerów jest nieinwazyjne i znajduje zastosowanie przede wszystkim w monitorowaniu aktywności NChZJ, a także do różnicowania zaburzeń czynnościowych ze zmianami zapalnymi. Nie mogą jednak służyć jako główne narzędzie diagnostyczne, ponieważ ich wynik może być ujemny w fazie remisji NChZJ, jak i dodatni u osób z nieobecnością NChZJ (103-107).

1.1.6 Leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit

Leczenie WZJG i ChLC opiera się przede wszystkim na farmakoterapii oraz uzupełnianiu niedoborów pokarmowych spowodowanych chorobą. W przypadku braku skuteczności leczenia zachowawczego, należy rozważyć metody chirurgiczne. Terapia powinna być zindywidualizowana i zależy od wielu czynników, m.in. od nasilenia i lokalizacji zmian chorobowych, stanu ogólnego pacjenta, masy ciała, dotychczasowej odpowiedzi na terapię, objawów pozajelitowych. Zaleca się rozpoczynanie terapii od leków słabiej działających oraz intensyfikację leczenia w przypadku ich nieskuteczności lub podczas zaostrzenia choroby (6, 8, 108).

Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego

Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) to leki o działaniu przeciwzapalnym oraz immunosupresyjnym. Znajdują one zastosowanie w podtrzymywaniu remisji u pacjentów z WZJG oraz ChLC. Do grupy tej zaliczamy mesalazynę oraz jej prototyp- sulfasalazynę. Skuteczność obu tych substancji jest podobna. Obecnie szeroko stosowane są przede wszystkim preparaty mesalazyny, z uwagi na lepszą tolerancję i mniej działań niepożądanych w porównaniu z sulfasalazyną. Mechanizm działania tych leków opiera się na hamowaniu wydzielania

cytokin prozapalnych oraz eliminacji wolnych rodników. Preparaty te dostępne są w postaci doustnej (tabletki, granulat) oraz doodbytniczej (czopki, wlewki).

Mesalazyna podawana doodbytniczo w dawce 1 g na dobę jest terapią z wyboru u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem odbytnicy o nasileniu łagodnym lub umiarkowanym. W przypadku bardziej rozległych zmian w przebiegu WZJG lub przy braku poprawy po zastosowaniu leczenia miejscowego, wskazane jest przewlekłe podawanie 5-ASA w dawce 2-4 g na dobę, przeważnie w połączeniu z preparatami 5-ASA podawanymi miejscowo lub z innymi lekami (6, 8, 108).

Preparaty 5-ASA podawane doustnie znajdują również zastosowanie u części pacjentów z ChLC, jednakże tutaj ich rola jest ograniczona. Korzyści z leczenia może odnieść część chorych ze zmianami zlokalizowanymi w jelicie krętym oraz w jelicie grubym. Terapię 5-ASA rozpoczyna się u pacjentów z chorobą o przebiegu łagodnym do średnio ciężkiego. Zalecana dawka dobową mesalazyny wynosi 3-4 g, a sulfasalazyny 3-6 g. Wyniki dużych badań klinicznych wykazały niewielką skuteczność 5-ASA w leczeniu ChLC, jednakże z uwagi na dobrą tolerancję leku i niski odsetek działań niepożądanych, są one nadal powszechnie stosowane w praktyce klinicznej (6, 8).

Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy jako silne leki przeciwzapalne znajdują zastosowanie w indukcji remisji zarówno u pacjentów z WZJG jak i z ChLC.

W przypadku NChZJ o średnio ciężkim i ciężkim przebiegu z rozległymi zmianami chorobowymi stosuje się sterydy systemowe, w postaci doustnej lub dożylniej. Najczęściej stosowane preparaty doustne to prednizon i metyloprednizolon. Standardowa dawka początkowa prednizonu wynosi 40-60 mg/ dobę, a metyloprednizolonu 60 mg/ dobę. Po uzyskaniu poprawy klinicznej należy stopniowo zmniejszać dawkę, o ok. 5 mg na tydzień aż do całkowitego odstawienia.

W ciężkiej postaci choroby stosuje się hydrokortyzon dożylnie w dawce 300-400 mg/ dobę. Z uwagi na liczne działania niepożądane, należy unikać podawania

preparatów dożylnych przez okres dłuższy niż 5 -7 dni. Po upływie tego okresu zaleca się zmianę drogi podania na doustną, stopniowo redukując dawkę.

W chorobie o łagodnym i średnio ciężkim przebiegu zastosowanie znajduje budesonid w postaci doustnej, który wykazuje silne działanie miejscowe i znacznie mniejsze działanie ogólnoustrojowe, co wiąże się z niższym ryzykiem działań niepożądanych. Przez pierwsze 4-8 tygodni lek podaje się w dawce 9 mg/dobę, a następnie zaleca się stopniową redukcję dawki (6 mg/ dobę przez 4 tygodnie i 3 mg/ dobę przez kolejne 4 tygodnie, aż do odstawienia).

Glikokortykosteroidy w postaci miejscowej znajdują zastosowanie w przypadku choroby zlokalizowanej w dystalnej części jelita. Są one ważnym uzupełnieniem terapii zarówno u pacjentów z zajęciem jedynie odbytnicy, jak i w przypadku zmian zlokalizowanych w bardziej proksymalnym odcinku okrężnicy. Dostępne są preparaty zawierające hydrokortyzon, budesonid i prednizon w postaci czopków, wlewek oraz pianek.

Należy pamiętać o działaniach niepożądanych glikokortykosteroidów, przede wszystkim przyjmowanych systemowo. Do najważniejszych powikłań sterydoterapii należą: cukrzyca posterydowa, osteoporoza, nadciśnienie tętnicze, zaćma, miopatia, martwica kości, podatność na zakażenia, wtórna niedoczynność kory nadnerczy. Z tego powodu zaleca się dążyć do jak najkrótszego ich podawania, a u chorych często lub długo poddawanych leczeniu steroidami należy regularnie wykonywać badania profilaktyczne oraz stosować suplementację wapnia i witaminy D3 w ramach prewencji osteoporozy (6-8, 27, 108).

Pochodne tiopuryny

Analogi purynowe, do których należą azatiopryna oraz 6-merkaptopryna znajdują zastosowanie u pacjentów z NChZJ, u których występują częste zaostrzenia choroby mimo przewlekłej terapii 5-ASA, a także w postaciach sterydozależnych i sterydoopornych NChZJ. Odgrywają również rolę w leczeniu przetok i zmian okołoodbytowych u pacjentów z ChLC. Wykazują one działanie immunosupresyjne oraz immunomodulujące, wpływają na gojenie błony śluzowej jelita i korzystnie

modyfikują przebieg choroby. Ich działanie obserwuje się dopiero po 2-3 miesiącach stosowania, nie są więc stosowane w indukcji remisji, ale zajmują ważne miejsce w terapii podtrzymującej oraz w profilaktyce nawrotów choroby po leczeniu operacyjnym. Zalecana dawka azatiopryny wynosi 2-3 mg/kg m.c./dobę, a 6-merkaptopuryny 1-1,5mg/kg m.c./dobę. Przeciwwskazaniem do stosowania tiopuryn jest przewlekła choroba nerek i niewydolność wątroby (6-8).

Metotreksat

Metotreksat (MTX) jest lekiem immunosupresyjnym, który poprzez hamowanie aktywności reduktazy folianowej upośledza syntezę DNA. Wykazuje również działanie przeciwzapalne wynikające z hamowania syntezy interleukiny 1 (IL-1). Podawany w iniekcji domięśniowej lub podskórnej w dawce 25 mg/ tydzień odgrywa rolę w indukcji remisji ChLC i zmniejsza zapotrzebowanie na glikokortykosteroidy. Lek ten znajduje również zastosowanie w podtrzymaniu remisji ChLC, wówczas zalecana dawka wynosi 15mg/ tydzień. Do potencjalnych efektów ubocznych stosowania MTX należy leukopenia oraz włóknienie wątroby, dlatego u pacjentów poddawanych tej terapii należy kontrolować morfologię krwi obwodowej oraz poziom enzymów wątrobowych (8, 23).

Cyklosporyna

Cyklosporyna jest lekiem immunosupresyjnym, który hamuje odporność humoralną i komórkową i blokuje wytwarzanie IL-2 przez limfocyty T pomocnicze. Efekt terapeutyczny tego leku pojawia się znacznie wcześniej niż w przypadku stosowania pochodnych tiopurynowych. Cyklosporyna podawana dożylnie jest stosowana z powodzeniem w ciężkim WZJG niereagującym na dożylne leczenie GKS. Często pozwala uniknąć kolektomii. Zalecena dawka to 2-4 mg/ kg m.c./ dobę w postaci dożylnej. Cyklosporyna podawana doustnie wykazuje niższą skuteczność, ale może być stosowana w dawce minimum 7,5 mg/ kg / dobę przy równoległym podawaniu 6-MP. Z uwagi na nefrotoksyczność tego preparatu, należy kontrolować czynność nerek przed jego włączeniem oraz podczas stosowania. Do innych częstych

efektów ubocznych stosowania cyklosporyny należą: nadciśnienie tętnicze, przerost dziąseł, hirsutyzm, parestezje, bóle głowy i zaburzenia elektrolitowe (8).

Leki biologiczne

Do grupy leków biologicznych zaliczamy substancje nowej generacji, które są przeciwciałami monoklonalnymi mającymi za zadanie hamowanie procesów immunologicznych oraz reakcji zapalnych.

Najpowszechniejszymi preparatami z tej grupy są infliksimab i adalimumab skierowane przeciwko czynnikowi martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor* = TNF). TNF jest główną cytokiną prozapalną oraz mediatorem zapalenia jelit. Leki biologiczne mają za zadanie zablokowanie TNF, hamując w ten sposób reakcję zapalną. Leki te znajdują zastosowanie w leczeniu sterydoopornej i sterydozależnej postaci NChZJ, a także są lekami pierwszego wyboru w terapii przetokowej postaci ChLC. Leki te często stosowane są równolegle z pochodnymi tiopuryn. Infliksimab jest chimerycznym mysio-ludzkim przeciwciałem monoklonalnym. Podawany jest w dawce 5 mg/ kg masy ciała we wlewie dożylnym w warunkach szpitalnych odpowiednich odstępach czasu: początkowo 3 dawki indukcyjne w tygodniu 0., 2. i 6., a następnie dawki podtrzymujące co 8 tygodni. Adalimumab natomiast to rekombinowane ludzkie przeciwciało monoklonalnym, które również wiąże się z TNF hamując procesy zapalne. Lek ten podawany jest podskórnym, początkowo w dawce 80 mg, a następnie w dawce podtrzymującej 40 mg co 2 tygodnie. Podskórna droga podania pozwala na administrację leku również w warunkach domowych. Kolejnym przykładem ludzkiego przeciwciała monoklonalnego o działaniu opartym na hamowaniu TNF jest golimumab, również podawany podskórnym.

Wedolizumab natomiast jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym o nieco innym mechanizmie działania- wiąże się z integryną $\alpha 4\beta 7$, która odpowiada za procesy zapalne w jelicie. Terapia z użyciem wedolizumabu dedykowana jest pacjentom, u których nieskuteczne było leczenie konwencjonalne lub z zastosowaniem inhibitorów anty-TNF, a także u tych, którzy tego leczenia nie tolerowali. Lek podaje się w warunkach szpitalnych w postaci wlewów dożylnych

zawierających 300 mg substancji czynnej, stosując 3 dawki indukcyjne w 0., 2. i 6., a następnie co 8 tygodni.

Do najnowszych leków biologicznych należy ustekinumab, będący ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IgG1κ. Jego działanie polega na hamowaniu aktywności cytokin prozapalnych IL-12 oraz IL-23. Stosowany jest u pacjentów z ChLC, którzy nie odnieśli korzyści z terapii konwencjonalnej lub z zastosowaniem inhibitorów anty-TNF oraz wykazujących nietolerancję tych leków. Pierwszą dawkę ustekinumabu podaje się dożylnie, w dawce 260 mg – 520 mg, natomiast kolejne dawki stosuje się podskórnie: jedna dawka po 8 tygodniach, a następne w odstępach co 12 tygodni.

Z uwagi na silne działanie immunosupresyjne, leków biologicznych nie wolno podawać w trakcie trwania aktywnej infekcji. Podczas kwalifikacji do leczenia pacjenci mają wykonywany szereg badań i konsultacji mających na celu wykluczenie ognisk zakażenia. Dodatkowe badania laboratoryjne wykonuje się również przed podaniem kolejnych dawek, celem uniknięcia groźnych powikłań będących następstwem immunosupresji (6, 8, 108).

Leczenie operacyjne

Pilne leczenie operacyjne konieczne jest u w stanach zagrożenia życia, takich jak: toksyczne rozdęcie okrężnicy, perforacja, masywny krwotok czy niedrożność przewodu pokarmowego. Leczenie chirurgiczne może się też okazać jedynym rozwiązaniem terapeutycznym u pacjentów z ciężkim rzutem choroby, nieodpowiadających na jakiegokolwiek leczenie farmakologiczne. Istnieją również wskazania do operacji w trybie planowym, które obejmują obecność raka lub stanów przedrakowych, nawrotowe przetoki, zwężenia jelita. W przypadku WZIG najczęściej stosowaną techniką operacyjną jest proktokolektomia z wytworzeniem zbiornika jelitowego, a w przypadku ChLC – odcinkowa resekcja jelita lub miejscowe usunięcie przetoki (6-8, 27, 108, 109).

1.2. Proteomika

Proteomika jest nową, rozwijającą się dziedziną nauki, która zajmuje się analizą proteomu, czyli profilowaniem białkowo-peptydowym w komórkach i tkankach. Umożliwia analizę praktycznie wszystkich białek występujących w organizmach żywych. Zaliczana jest do tak zwanych technologii „omicznych”, wśród których wyróżnia się genomikę (zajmującą się badaniem genomu), transkryptomikę (analizującą RNA), proteomikę (obejmującą badanie białek i peptydów) oraz metabolomikę (skupiającą się na badaniu metabolitów). Dzięki rozwojowi tych metod możliwe jest analizowanie ogromnej ilości danych, które pozwalają na ocenę całego genomu, transkryptomu, proteomu czy metabolomu, który stanowi zbiór informacji o danym organizmie. Termin „proteomika” powstał z połączenia słów „*proteins*” (ang. białka) oraz „*genomics*” (z ang. genomika). Jest to gałąź nauki, która pozwala zbadać i zrozumieć procesy biologiczne zachodzące w ustroju, poprzez dogłębną analizę białek oraz peptydów prezentowanych w komórkach oraz tkankach. Z uwagi na fakt, że genomika i transkryptomika nie dają możliwości zbadania wszystkich zjawisk zachodzących w organizmie, rośnie zainteresowanie dziedzinami pokrewnymi z zakresu biologii systemów: proteomiką i metabolomiką. Proteom, czyli profil białkowo-peptydowy danego osobnika występujący w danym momencie, w przeciwieństwie do genomu jest dynamiczny i niejednorodny, ponieważ przez cały czas zmienia się skład białkowy organizmu i towarzyszące temu procesy (110-115).

W ostatnich latach intensywnie rozwija się proteomika kliniczna, która poprzez poszukiwanie różnic w profilu białkowym osób chorych i zdrowych dąży do identyfikacji nowych markerów biologicznych, czyli wskaźników w płynach ustrojowych pomocnych w diagnostyce różnych schorzeń. Analizie proteomicznej można poddawać łatwe do pozyskania materiały tkankowe takie jak: krew, mocz, kał czy ślina. Identyfikacja profilu białkowo-peptydowego pobranej tkanki prowadzi do lepszego zrozumienia zmian zachodzących podczas choroby i może znaleźć zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny. Wykrywane białka i peptydy występują w różnych formach i postaciach, ponieważ ulegają ciągłym przemianom. Większość dotychczas przeprowadzonych badań proteomicznych dotyczyła dziedziny

onkologii. W ostatnich latach zaczęły pojawiać się również doniesienia naukowe dotyczące zastosowania proteomiki w diagnostyce chorób reumatycznych, neurodegeneracyjnych, psychicznych, ale także kardiologicznych oraz gastroenterologicznych. Metody te są niezwykle obiecujące, ponieważ umożliwiają wykrywanie zmian chorobowych już na poziomie komórki, co stwarza nadzieję na wczesne rozpoznawanie chorób jeszcze przed wystąpieniem pełnej manifestacji klinicznej. Często zmiany wywołwane daną chorobą dotyczą białek występujących w materiale biologicznym w znikomych ilościach, które nie mogą być wykryte za pomocą tradycyjnych badań laboratoryjnych, ale staje się to możliwe dzięki technikom proteomicznym. (114, 116-121).

Najczęściej wykorzystywane techniki w analizach proteomicznych to spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS) i elektroforeza dwuwymiarowa (ang. *two-dimensional electrophoresis*, 2-DE). Spektrometria mas może być stosowana w połączeniu z chromatografią gazową (ang. *gas chromatography*, GC) lub ciekłą (ang. *liquid chromatography*, LC). Badania te prowadzone są *in vitro* i umożliwiają analizę ilościową lub jakościową dziesiątek, a nawet setek peptydów podczas jednego badania. Profilowanie białkowo- peptydowe pozwala uzyskać całościowy profil związków białkowych w danej próbce zwany proteomem. Masa cząsteczek wykrywanych podczas badań proteomicznych mierzona jest w Daltonach [Da]. Jeden Da odpowiada 1/12 masy atomu węgla ^{12}C , a zakres widm stosowany w tych technikach wynosi zwykle 1000-10000 Da. Poszczególne cząsteczki peptydów na kolejnym etapie badania poddawane są identyfikacji, a interpretacja wyników odbywa się z pomocą systemów bioinformatycznych (122, 123).

Badania proteomiczne prowadzone u pacjentów z NChZJ zmierzają do zidentyfikowania biomarkerów, które umożliwiłyby lepszą i łatwiejszą diagnostykę oraz monitorowanie choroby, bez potrzeby narażania pacjentów na powtarzalne badania endoskopowe. Analizy proteomu zmierzają głównie do wyodrębnienia profilu białkowo- peptydowego charakterystycznego dla chorujących na NChZJ, co pozwoliłoby odróżnić ich od osób zdrowych. Dotychczas nie ma bowiem określonego parametru biologicznego- biomarkera, na podstawie którego można byłoby

jednoznacznie postawić rozpoznanie WZJG lub ChLC. (5, 8, 124). Powstają również prace na temat zastosowania profilowania białkowo-peptydowego w monitorowaniu przebiegu choroby oraz odpowiedzi na zastosowaną terapię. Taki sposób wykorzystania tej metody znacznie ułatwiłby dobór leczenia i poprawę opieki nad chorymi (125-127).

Najczęściej badanym materiałem biologicznym w diagnostyce proteomicznej NChZJ jest osocze. Jest łatwy do pozyskania i należy do materiałów najpowszechniej poddawanych wszelakim analizom. Możliwa jest również analiza proteomiczna moczu pacjentów z NChZJ, która może być wykorzystana z uwagi na różnice w składzie białek wydalanych z moczem przez chorych na WZJG i ChLC. Istnieją również doniesienia dotyczące analizy proteomicznej materiału tkankowego ze zmienionej zapalnie błony śluzowej jelita u pacjentów chorujących na WZJG i ChLC, które miały za zadanie przede wszystkim zrozumienie zmian, jakie zachodzą w profilu białkowo-peptydowym chorych z NChZJ (118, 128-130).

2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA

Głównym założeniem badania jest wykazanie różnic pomiędzy profilem białkowo-peptydowym pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz osób zdrowych. Podjęto się również próby wykazania różnic pomiędzy proteomem pacjentów będących w okresie zaostrzenia choroby a proteomem pacjentów pozostających w remisji klinicznej. W przyszłości badania te mogłyby posłużyć do diagnostyki nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz monitorowania ich przebiegu.

Cele badania:

- 2.1. Przeprowadzenie analizy proteomicznej surowicy krwi pacjentów rozpoznaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wśród przedstawicieli grupy kontrolnej.
- 2.2. Identyfikacja wykrytych peptydów.
- 2.3. Wykazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilem proteomicznym pacjentów chorujących na nieswoiste choroby zapalne jelit a profilem proteomicznym osób zdrowych.
- 2.4. Wykazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilem proteomicznym pacjentów z rozpoznaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego a profilem proteomicznym pacjentów z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego-Crohna.
- 2.5. Wykazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilem proteomicznym pacjentów chorujących na nieswoiste choroby zapalne jelit w okresie zaostrzenia choroby a profilem proteomicznym pacjentów pozostających w remisji.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zgoda komisji bioetycznej

Na przeprowadzenie badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu: Uchwała nr 928/16 z dnia 15.09.2016 r.

3.2. Charakterystyka grupy badanej

Do badania zakwalifikowano 95 pacjentów obojga płci, w przedziale wiekowym od 18 do 70 lat, którzy byli hospitalizowani w Klinice Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2016 – 2018. Osoby te podzielono na trzy główne grupy o zbliżonej liczebności. Pierwszą z nich stanowiło 30 pacjentów z rozpoznaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG), drugą tworzyło 35 pacjentów z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego-Crohna (ChLC), a do trzeciej grupy zakwalifikowano 30 osób zdrowych, stanowiących w badaniu grupę kontrolną. Dodatkowo wśród osób z rozpoznaniem NChZJ wyodrębniono grupę pacjentów będących w okresie zaostrzenia oraz grupę w okresie remisji klinicznej choroby.

Każda osoba biorąca udział w badaniu została zapoznana z celem pracy oraz przebiegiem badań i podpisała świadomą zgodę na udział w projekcie. Ze wszystkimi pacjentami przeprowadzono dokładny wywiad lekarski, badanie przedmiotowe oraz poproszono o wypełnienie ankiety na temat aktualnego stanu zdrowia i wywiadów chorobowych. Aktywność choroby oceniano posługując się klasyfikacją montrealską u pacjentów z WZJG oraz skalą CDAI u pacjentów z ChLC. Każdy pacjent został również zważony i zmierzony. Podczas hospitalizacji wszyscy uczestnicy badania mieli wykonane również rutynowe analizy laboratoryjne krwi związane z pobytem w szpitalu, w skład których wchodziły m.in.: morfologia krwi obwodowej, stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi, stężenie kreatyniny i elektrolitów w

surowicy krwi. W zależności od sytuacji klinicznej, u niektórych pacjentów wykonywano również badania obrazowe i endoskopowe.

Głównym kryterium włączenia chorych do badania było pewne rozpoznanie WZJG lub ChLC potwierdzone oceną histopatologiczną materiału pobranego podczas kolonoskopii. Część pacjentów miała rozpoznanie postawione wcześniej, a inni zostali zdiagnozowani podczas hospitalizacji. Chorzy byli kwalifikowani do badania niezależnie od czasu trwania choroby i stosowanej farmakoterapii. Do projektu włączano jedynie osoby pełnoletnie.

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano pacjentów, u których wykonano kolonoskopię w ramach diagnostyki chorób przewodu pokarmowego i wykluczono obecność jakiegokolwiek choroby zapalnej jelit, zarówno w endoskopowym obrazie makroskopowym jak i w badaniu histopatologicznym. Ponadto, na podstawie wykonanych badań laboratoryjnych (morfologia krwi obwodowej, CRP) wykluczono u nich obecność aktywnego procesu zapalnego.

Dokonując podziału pacjentów z rozpoznaniem NChZJ na chorych w okresie zaostrzenia i w okresie remisji choroby, jako główne kryteria remisji przyjęto zgodnie z wytycznymi ECCO (*European Crohn's and Colitis Organisation z 2017r.*):

- Wśród pacjentów z WZJG: aktywność S0 (brak objawów klinicznych) wg klasyfikacji montrealskiej i częstość wypróżnień do 3x/dobę, bez domieszki krwi (5)
- Wśród pacjentów z ChLC: <150 punktów w skali CDAI oraz poziom CRP w osoczu <10 mg/l (8)

Wobec wszystkich 95 osób biorących udział w projekcie zastosowano następujące kryteria wykluczające z badania:

- wiek poniżej 18 lat i powyżej 70 lat
- choroba trzewna i pozostałe zespoły zaburzeń wchłaniania (inne niż NChZJ)

- wrodzone choroby metaboliczne (np. galaktozemia, fenylketonuria, choroba Wilsona)
- obecna choroba nowotworowa lub przebyta w przeszłości
- żywienie pozajelitowe
- uzależnienie od narkotyków lub alkoholu

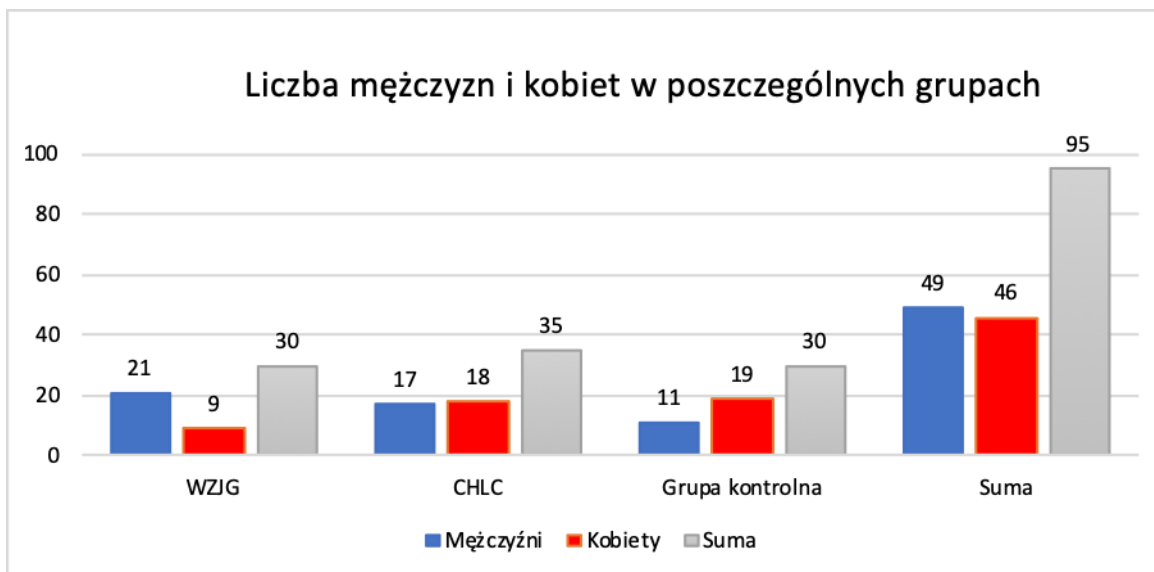
W projekcie wzięło udział łącznie 49 mężczyzn i 46 kobiet w wieku od 18 do 70 lat. Średnia wieku wszystkich pacjentów wynosiła: 39,59 lat. W grupie chorych z rozpoznaniem WZJG wynosiła ona 38,07 lat, w grupie pacjentów z ChLC 35,29 lat, natomiast wśród przedstawicieli grupy kontrolnej 46,13 lat.

Wśród chorych z rozpoznaniem WZJG 21 pacjentów było w okresie zaostrzenia, a 9 w okresie remisji. W grupie pacjentów z ChLC 27 znajdowało się w okresie zaostrzenia, natomiast 8 w remisji. Łącznie, spośród wszystkich 65 osób z rozpoznaniem NChZJ, 48 było w okresie zaostrzenia, a 17 w okresie remisji choroby.

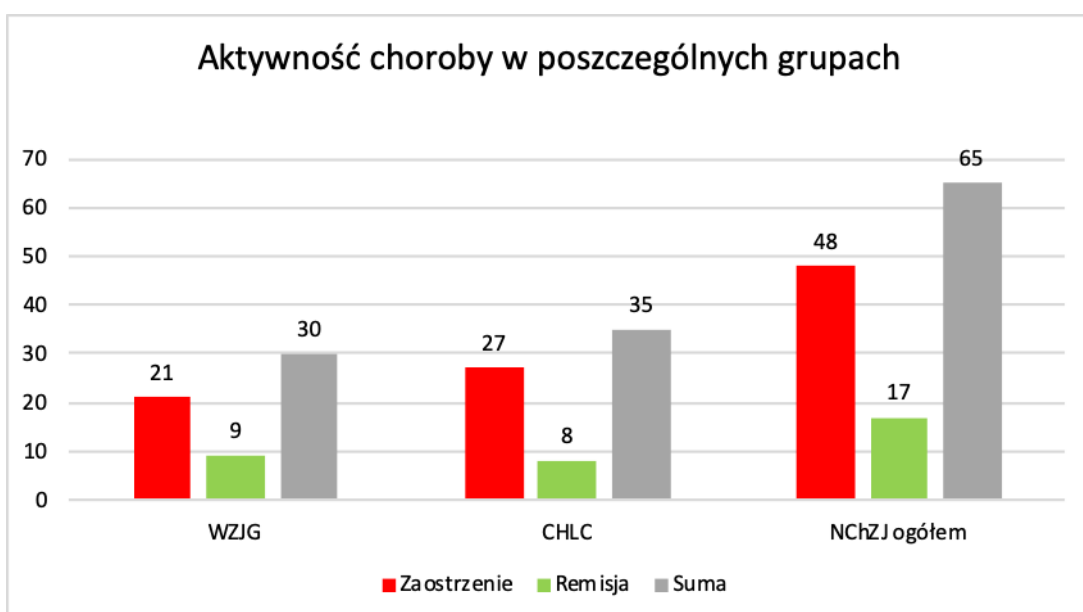
Ogólną charakterystykę pacjentów włączonych do badania ilustruje tabela 5 oraz ryciny 1-2.

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów włączonych do badania.

Liczba pacjentów ogółem	95
Płeć (M : K)	49 : 46
Liczba pacjentów z WZJG	30 (21 M, 9 K)
Liczba pacjentów z ChLC	35 (17 M, 18 K)
Liczba pacjentów grupy kontrolnej	30 (11 M, 19 K)
Wiek	18 – 70 lat



Rycina 1. Zróżnicowanie pacjentów pod względem płci.



Rycina 2. Zróżnicowanie pacjentów pod względem aktywności choroby.

3.3. Metodyka badań

Materiał do badań stanowiły próbki surowicy krwi o objętości 7,5 ml pobrane od każdego pacjenta, który wyraził zgodę na udział w projekcie oraz spełniał kryteria włączenia do badania. Próbka krwi na skrzep pobierana była podczas wykonywania rutynowych badań laboratoryjnych związanych z hospitalizacją w Klinice Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki. U wszystkich pacjentów pobranie odbywało się na czczo.

Bezpośrednio po pobraniu, materiał był przekazywany do Pracowni Endokrynologii Molekularnej przy Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, gdzie każda próbka surowicy była tam odwirowywana przez 15 minut, z prędkością 4000 obrotów/minutę. Następnie materiał przechowywano w zamrażarce o temp. – 80C aż do momentu przekazania go do analizy proteomicznej. Transport odbywał się również w ściśle przestrzeganych warunkach chłodniczych.

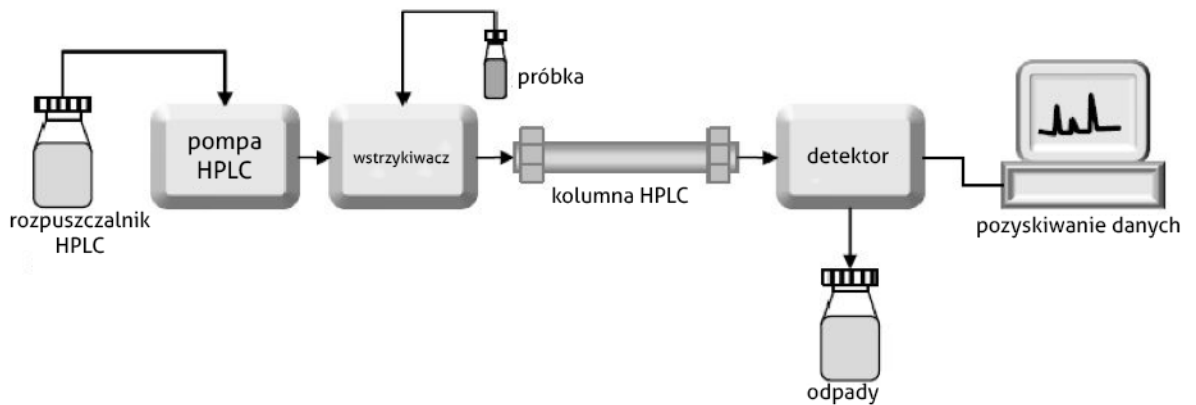
Analizę proteomiczną materiału przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania wykonano przy użyciu spektrometru mas MALDI-TOF/TOF firmy Bruker Daltonics.

Badanie proteomiczne składa się z następujących etapów:

- Obróbka wstępna próbek
- Izolacja i rozdział białek
- Identyfikacja białek i peptydów
- Analiza bioinformatyczna proteomu

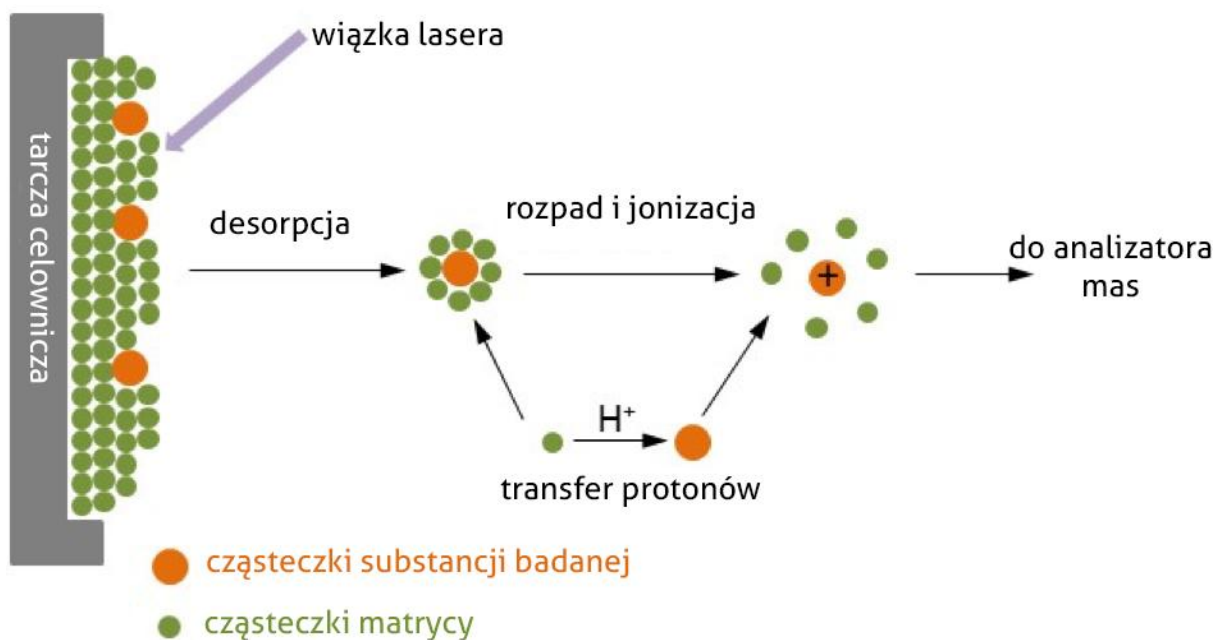
Do rozdziału białek wykorzystano wysokosprawną chromatografię ciekową (ang. *high-performance liquid chromatography* – HPLC). W metodzie tej analizowana próbka rozpuszczana jest w odpowiednim rozpuszczalniku, a następnie roztwór ten kierowany jest na kolumnę wypełnioną złożem. Rolę cieczy nośnej (fazy ruchomej) pełni wcześniej przygotowana mieszanina, tzw. eluent. W wyniku oddziaływań

międzycząsteczkowych między związkami badanej próbki, a wypełnieniem kolumny odbywa się rozdział. Analiza jednej próbki trwa od kilku do kilkudziesięciu minut (131, 132). Schemat działania HPLC ilustruje rycina 3.



Ryc. 3. Schemat działania HPLC [na podstawie: (131, 132)].

Identyfikację białek i peptydów przeprowadzono za pomocą techniki MALDI-TOF-MS (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*), czyli spektrometrii mas z zastosowaniem laserowej desorpcji i jonizacji z udziałem matrycy i analizatorem czasu przelotu. Desorpcja polega na uwalnianiu cząsteczek, atomów lub jonów z jednej fazy fizycznej do drugiej. Stosowana podczas tego procesu wiązka lasera musi być dobrana w taki sposób, aby nie doprowadzić do fragmentacji cząsteczek, a jedynie do ich wybicia z matrycy. Następnie ulegają one jonizacji i są przechwytywane przez analizator mas. Przebieg procesów zachodzących pod wpływem impulsu laserowego przy użyciu techniki MALDI przedstawiono na rycinie 4.



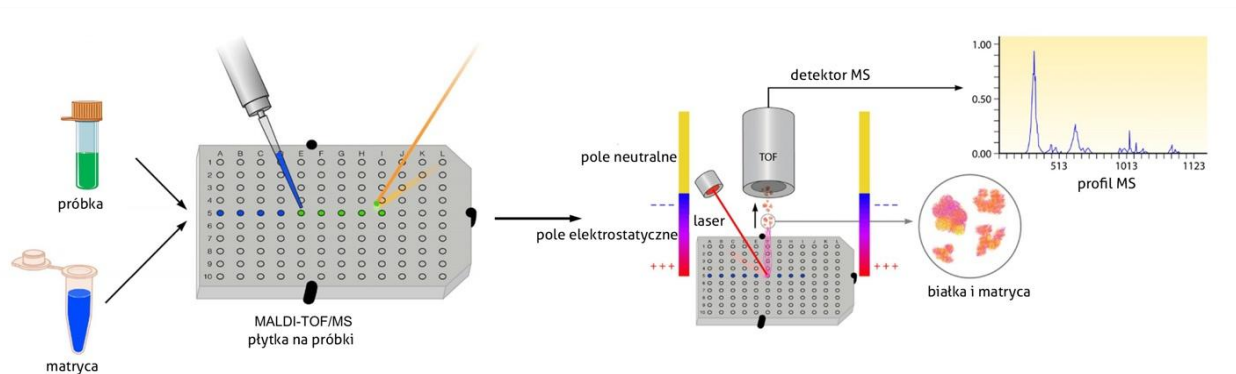
Ryc. 4. Procesy zachodzące pod wpływem impulsu laserowego - technika MALDI [na podstawie (133)].

Spektrometria mas umożliwia pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego [m/z] danego jonu, co pozwala na rozpoznanie poszczególnych związków występujących w badanej próbce.

W spektrometrze mas występują trzy główne elementy:

- źródło jonów, czyli miejsce jonizacji cząsteczek
- analizator, w którym zjonizowane cząsteczki ulegają rozdzielaniu na podstawie stosunku ich masy do ładunku elektrycznego
- detektor, którego zadaniem jest zliczanie jonów napływających z analizatora

Wynik pomiaru otrzymywany po zakończeniu badania obrazowany jest za pomocą widma masowego (134, 135). Schemat działania metody MALDI-TOF MS ilustruje rycina 5.



Ryc.5. Etapy analizy próbek przy pomocy MALDI- TOF MS [na podstawie (134)].

Do badania przygotowano 95 próbek. Wszystkie były przechowywane w takich samych warunkach, a do pracy z nimi używano zawsze tego samego sprzętu laboratoryjnego. Każda próbka odwirowanej surowicy krwi po rozmrożeniu została rozcieńczona w 0,1% kwasie trifluoroctowym (ang. *trifluoroacetic acid* - TFA) oraz wodzie w stosunku 1:5 (136).

Z uwagi na fakt, że w surowicy krwi znajduje się wiele białek nie mających istotnego znaczenia diagnostycznego w analizie proteomicznej (np. albuminy, globuliny), a mogących utrudnić detekcję poszukiwanych peptydów występujących w mniejszym stężeniu, badane próbki poddano wstępnej obróbce. Polegała ona na oczyszczeniu materiału z białek utrudniających dalszą analizę oraz na zatężeniu badanego materiału. Proces ten przeprowadzono przy użyciu końcówek do pipet typu Zip- Tip, które wypełnione były złożem C18. Końcówki pipet przemyto acetonitrylem (ang. *acetonitrile* - ACN) oraz 0,1% TFA. Przygotowane próbki pobierano na końcówki pipety. Po przemyciu 0,1% TFA frakcje próbek eluowano przy użyciu 50% ACN w 0,1% TFA (136).

Każdą próbkę zmieszano z matrycowym roztworem kwasu α -cyano-4-hydroksycynamonowego (ang. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, HCCA). Roztwór ten składał się z 0,3 g/l HCCA rozpuszczonego etanolu i acetonie występujących w proporcjach 2:1. Stężenie roztworu wynosiło 1:10. Po jednym mikrolitrze mieszaniny próbki i roztworu matrycowego umieszczano w dołkach na płytce MALDI i

pozostawiano w temperaturze pokojowej celem krystalizacji. Próbki ze wszystkich trzech grup pacjentów badane były w kolejności losowej celem minimalizacji ryzyka błędu. Do analiz użyty został spektrometr UltraXtreme MALDI-TOF/TOF firmy Bruker Daltonics, który zaprezentowany został na rycinie 6.



Ryc.6. Fotografia przedstawiająca zestaw do badań proteomicznych składający się ze spektrometru mas UltrafleXtreme (Bruker), chromatografu cieczonego Easy-nLC II (Bruker) oraz kolektora frakcji Proteineer fc II (Bruker). Własność Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Autorem fotografii jest dr Paweł Dereziński.

Dodatkowo naładowane jony były wykrywane w zakresie stosunku masy do ładunku w zakresie 1000 – 10 000 Da, a dla jednego widma wykonywano 2000 uderzeń lasera. Otrzymane widma spektrometrii mas kalibrowano przy użyciu mieszaniny Peptide Calibration Standard oraz Protein Calibration Standard I w stosunku 1:5.

Próbki przygotowane zostały za pomocą techniki ZipTip. Otrzymany eluent poddawano rozdzielaniu przy użyciu systemu nano-LC składającego się z kolumny pułapki, NS-MP-10 BioSphere C18 (o wymiarach 20mm x 100 μ m I.D., rozmiar cząsteczki 5 μ m, rozmiar porów 120 Å) oraz kolumny Thermo Scientific Acclaim

PepMap 100 C18 (o wymiarach 150mm x 75um I.D., rozmiar cząsteczki 3 µm, rozmiar porów 100 Å). Gradient liniowy wynosił 2% - 50% ACN w ciągu 96 minut. Użyto dwóch faz mobilnych: faza A składała się z 0,05% TFA w wodzie, a faza B z 0,05 TFA w 90% ACN). Objętość wstrzykiwanej próbki eluentu wynosiła 4 µl. Separacja odbywała się przy prędkości przepływu 300nL/min. Każdy eluent automatycznie mieszano z roztworem matrycowym i fosforanem amonu, a następnie наносono na zestaw MALDI (AnchorChip 800 µm). System był kontrolowany przez oprogramowanie HyStar 3.2. Do dalszych analiz użyto spektrometru MALDI-TOF/TOF pracującego w trybie reflektora. Widma MS były kalibrowane przy użyciu mieszaniny Peptide Calibration Standard. Przetwarzanie i weryfikacja otrzymywanych danych odbywały się przy pomocy programu Flex Analysis firmy Bruker Daltonics. Do poszukiwania baz danych białek używano programu Bio Tools 3.2., również firmy Bruker Daltonics. Identyfikacja białek odbywała się przy użyciu bazy danych SwissProt oraz wyszukiwarki danych Mascot 2.4.1 firmy Matrix Science (136).

Analiza bioinformatyczna danych

Wyniki otrzymane w badaniach metodą spektrometrii MALDI- TOF MS poddano analizie statystycznej przy użyciu programu ClinProTools 3.0 firmy Bruker Daltonics. Zadaniem tego programu jest tworzenie modeli w oparciu o trzy algorytmy:

- algorytm genetyczny (ang. *genetic algorithm* – GA)
- nadzorowana sieć neuronowa (ang. *supervised neural network* – SNN)
- szybki klasyfikator (ang. *quick classifier* – QC)

Otrzymane modele umożliwiają klasyfikację grup objętych badaniem. Algorytm genetyczny (GA) jest modelem w zamyśle naśladowującym zjawisko ewolucji. Daje on możliwość wyboru takich kombinacji pików, które będą prowadzić do jak najlepszego odróżnienia dwóch grup między sobą. Przy jego zastosowaniu wybierane są najbardziej dopasowane zbiory pików, a odrzucane są zbiory mniej pasujące. Nadzorowana sieć neuronowa (SNN) to algorytm oparty na zasadzie klasyfikacji prototypu. Jego zadaniem jest identyfikacja widm charakterystycznych dla grupy

badanej i kontrolnej, które uznawane są za prototypy. Na ich podstawie przyporządkowywane są pozostałe widma. Szybki klasyfikator (QC) to jednoczynnikowy klasyfikator sortujący. Przy użyciu tego modelu ma miejsce klasyfikacja na podstawie średniej ważonej z powierzchni wszystkich pików (137).

Dodatkowo oblicza się wskaźniki mówiące o wydajności modelu- jest to walidacja krzyżowa, zdolność rozpoznawania i walidacja zewnętrzna. Walidacja krzyżowa pozwala na ocenę działania klasyfikatora wykorzystującego określone parametry w oparciu o konkretne dane. Zdolność rozpoznawania obrazuje odsetek osób objętych badaniem prawidłowo przyporządkowanych do grupy badanej i grupy kontrolnej. Walidacja zewnętrzna przypomina walidację krzyżową, ale wymaga osobnego zbioru danych to testowania zdolności klasyfikacyjnych tego modelu (137).

W trakcie analiz dokonano następujących porównań między grupami badanymi: ChLC z grupą kontrolną, WZJG z grupą kontrolną, ChLC z WZJG, a także wszystkich chorujących na NChZJ (ChLC + WZJG) z grupą kontrolną. Wyniki te poddano wielowymiarowej analizie statystycznej z wykorzystaniem wyżej opisanych algorytmów. Zidentyfikowano również peptydy na podstawie stosunku ich masy do ładunku elektrycznego $[m/z]$ wyrażonej w daltonach [Da]. Oprogramowanie zastosowało funkcję grupowania widm mas dla danego zbioru próbek. Każde widmo najpierw normalizowano do całkowitego prądu jonów, a następnie kalibrowano z widocznymi wspólnymi wartościami m/z . Widma przetwarzano w zakresie mas 1000 – 10 000 Da. Na podstawie analizy widm zidentyfikowano piki m/z , które zostały sklasyfikowane jako różnicujące dla danych grup. Metoda ta charakteryzuje się najwyższą rozdzielczością dla peptydów o wartościach mas poniżej 3500 Da, stąd też piki o wyższych wartościach nie zostały uwzględnione w końcowej analizie (136).

4. WYNIKI

Analizie proteomicznej poddano próbki surowicy pobrane od 95 pacjentów, wśród których 35 miało rozpoznaną ChLC, 30 - WZJG oraz 30 stanowiło grupę kontrolną. Po odpowiedniej obróbce próbki analizowano za pomocą spektrometru MALDI TOF/TOF. Zakres mas wynosił od 1000 do 10 000 Da. Otrzymane widma poddano analizie statystycznej przy użyciu programu ClinPro Tools 3.0. Program ten korzysta z trzech omówionych wcześniej algorytmów (GA, SNN i QC) służących do obliczania różnic statystycznych pomiędzy analizowanymi grupami.

W badaniu dokonano analizy porównawczej następujących grup:

- grupy pacjentów z rozpoznaniem WZJG z grupą kontrolną,
- grupy pacjentów z rozpoznaniem ChLC z grupą kontrolną,
- grupy pacjentów z rozpoznaniem ChLC z grupą pacjentów z rozpoznaniem WZJG
- grupy pacjentów z rozpoznaniem NChZJ (będącej sumą grup z rozpoznaniem ChLC oraz WZJG) z grupą kontrolną
- grupy pacjentów będących w okresie zaostrzenia NChZJ z grupą pacjentów będących w okresie remisji choroby

Do każdej analizy porównawczej zastosowano każdy z trzech algorytmów (GA, SNN i QC). Umożliwiło to wykrycie różnic w profilach peptydowych badanych grup. Dla każdego z algorytmów wyliczono zdolność rozpoznawania, walidację krzyżową i walidację zewnętrzną. Zgodnie z zasadą, do końcowej interpretacji wyników dla każdej analizy wybrano algorytm o najwyższych wartościach walidacji krzyżowej, zdolności rozpoznawania i walidacji zewnętrznej, gdyż taki model cechuje się najwyższą wiarygodnością. Do analiz statystycznych zastosowano trzy testy: test T-studenta, Anderson-Darling oraz Wilcoxona. Miarą istotności statystycznej była wartość $p < 0,05$ w przynajmniej dwóch z trzech testów.

4.1. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z wynikami osób zdrowych

Liczebność próbek: 60

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG): 30

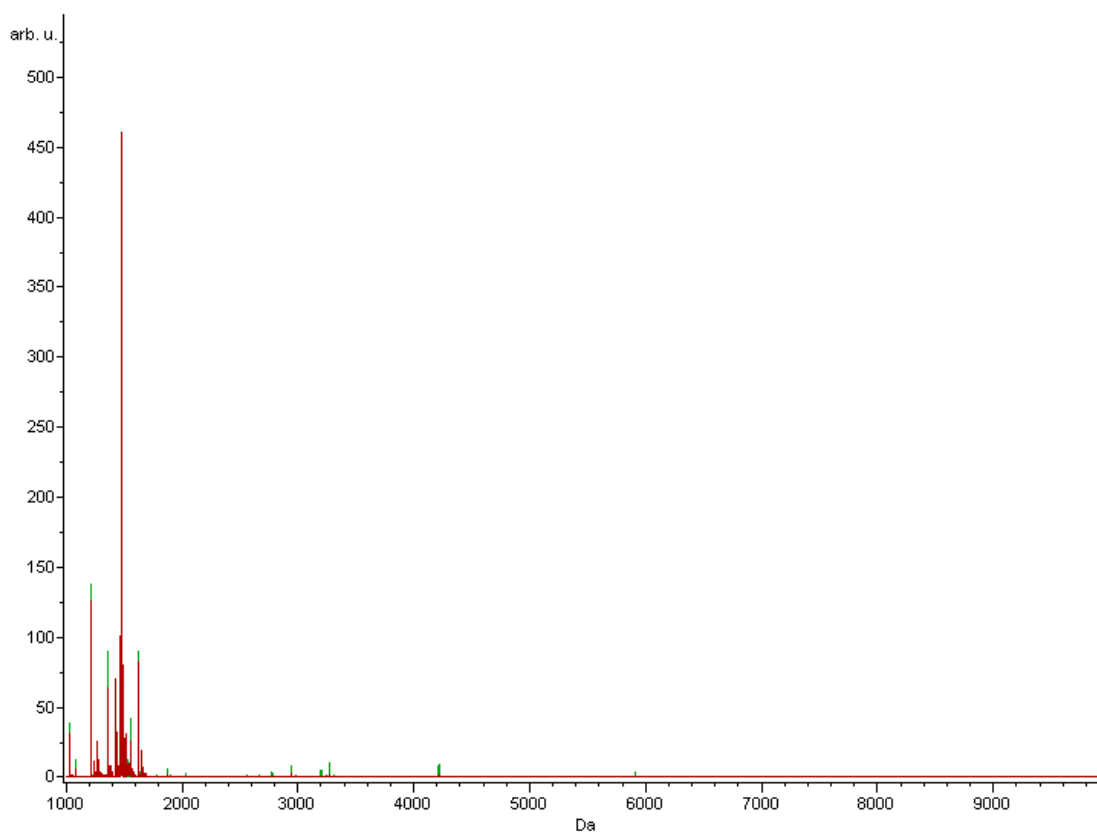
Grupa kontrolna (kontrola): 30

Analiza proteomiczna próbek osocza pacjentów z WZJG i osób z grupy kontrolnej wykazała różnice w profilu białkowo-peptydowym tych grup.

Najwyższe wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania wykazano dla algorytmu SNN, jednakże jako bardziej różnicujący należy przyjąć algorytm GA, który cechują zbliżone do SNN wartości walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania oraz znacznie wyższe niż w algorytmie SNN wartości walidacji zewnętrznej (tabela 9).

łącznie uzyskano 114 pików.

Średnie widma masowe charakterystyczne dla tych grup ilustruje rycina 7.



Ryc.7. Średnie widma dla grup: **WZIG**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony. Oś rzędnych- intensywność sygnału, oś odciętych – stosunek masy do ładunku elektrycznego peptydów [m/z] wyrażona w Daltonach [Da].

Raporty dla poszczególnych algorytmów ilustrują poniższe zestawienia.

Tabela 6. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **algorytmu genetycznego (GA)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z rozpoznaniem **WZIG** z **grupą kontrolną**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
WZIG	66,67%	100%
kontrola	96,67%	100%
Ogółem	81,67%	100%

Tabela 7. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **nadzorowanej sieci neuronowej (SNN)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
WZJG	66,67%	100%
Kontrola	100%	100%
Ogółem	83,33%	100%

Tabela 8. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **szybkiego klasyfikatora (QC)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
WZJG	50%	100%
Kontrola	86,67%	100%
Ogółem	68,33%	100%

Tabela 9. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Najwyższe wartości walidacji krzyżowej, zdolności rozpoznawania oraz walidacji zewnętrznej osiągnięto dla algorytmu **GA**.

Algorytm	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna [%]	
			WZJG	Kontrola
GA	81,7	100	50	100
SNN	83,3	100	16,7	100
QC	68,3	100	16,7	100

Najbardziej charakterystyczne piki (fragmenty peptydów użyte do klasyfikacji) dla każdego z prezentowanych modeli przedstawiono poniżej. Dla algorytmu GA wykryto 15 pików, natomiast 13 dla algorytmu SNN oraz 5 dla algorytmu QC. Niektóre z nich były wspólne dla kilku algorytmów.

Tabela 10. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **WZIG z grupą kontrolną**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Algorytm GA	Algorytm SNN	Algorytm QC
1504,36	1419,09	1488,22
1519,6	1504,36	1509,96
5336,02	1488,22	1519,6
1228,99	1638,98	3951,87
3964,46	1457,2	9136,25
1488,22	3964,46	
1435,15	2022,05	
1568,02	3262,46	
1261,15	5904,22	
1419,09	1519,6	
5752,85	1440,74	
1638,98	3301,99	
4090,27	1228,99	
1389,17		
4230,65		

Istotność statystyczną pików otrzymanych dla poszczególnych algorytmów ilustrują tabele 11-13.

4.1.1. Algorytm GA

Dla wszystkich otrzymanych pików obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson-Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm GA (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxon (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1504,36	0,0127	0,000458	0,00000817
1519,6	0,000005	0,000159	0,531
5336,02	$<0,000001$	0,000458	0,0777
1228,99	0,0541	0,0127	$<0,000001$
3964,46	0,00000479	0,0013	0,22
1488,22	0,0121	0,000156	$<0,000001$
1435,15	0,12	0,0127	$<0,000001$
1568,02	0,0789	0,00738	0,000751
1261,15	0,0978	0,0211	0,00000105
1419,09	0,0523	0,000375	$<0,000001$
5752,85	$<0,000001$	0,000857	0,172
1638,98	0,0284	0,000159	$<0,000001$
4090,27	$<0,000001$	0,000159	0,00692
1389,17	0,2	0,0955	$<0,000001$
4230,65	0,0000292	0,00385	0,000556

Spośród 15 pików otrzymanych dla algorytmu GA, dla 5 z nich wykazano istotność statystyczną we wszystkich 3 testach. Są to peptydy o wartościach m/z wynoszących: 1504,36 Da, 1488,22 Da, 1638,98 Da, 4090,27 Da oraz 4230,65 Da.

Dla 4 pików wykazano istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxon, natomiast nie wykazano takiej istotności w teście Anderson-Darling. Są to peptydy o wartościach m/z równych: 1519,6 Da, 5336,02 Da, 3964,46 Da, 5752,85 Da.

Piki o wartościach m/z wynoszących 1228,99 Da, 1435,15 Da, 1568,02 Da, 1261,15 Da oraz 1419,09 Da uzyskały istotność statystyczną w teście Wilcoxon oraz Anderson-Darling, natomiast nie wykazano dla nich istotności w teście t-Studenta. Pozostały pik o m/z równej 1389,17 Da nie spełnił kryterium istotności w minimum dwóch testach.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu GA

Przy zastosowaniu algorytmu GA możliwa była identyfikacja 4 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1504,36 – dopełniacz C3

1519,6 – dopełniacz C3 (oksydacja)

5336,02

1228,99

3964,46

1488,22

1435,15 – dopełniacz C4a

1568,02 – kininogen-1

1261,15

1419,09

5752,85

1638,98

4090,27

1389,17

4230,65

Do identyfikacji kwalifikowano piki o wartości m/z poniżej 3500 Da z uwagi na ograniczoną rozdzielczość metody. Peptydy o wyższej masie musiały zostać wyeliminowane i wykreślono je z powyższego zestawienia.

Odrzucono również pik o m/z= 1389,17 Da, ponieważ nie spełnił warunku istotności statystycznej.

Pozostało 9 pików, które według algorytmu GA mogą służyć różnicowaniu pacjentów z WZJG z pacjentami z grupy kontrolnej. Trzy spośród nich uzyskały istotność statystyczną we wszystkich testach i uznano je za najbardziej różnicujące. Są to peptydy o m/z równej: **1504,36** Da (fragment zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3), **1488,22** Da oraz **1638,98** Da.

Ponadto, dla 6 fragmentów peptydów o m/z poniżej 3500 Da uzyskano istotność statystyczną w dwóch testach, zostały zatem również zakwalifikowane jako różnicujące. Dla pików o m/z **1519,6** Da (zidentyfikowanego jako cząsteczka dopełniacza C3 – forma po oksydacji) otrzymano istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxon, natomiast piki o m/z **1435,15** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C4a), **1568,02** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka kininogenu-1), a także **1228,99** Da, **1261,15** Da oraz **1419,09** Da uzyskały istotność statystyczną w teście Wilcoxon oraz Anderson-Darling.

4.1.2. Algorytm SNN

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu SNN również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson-Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm SNN (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxon (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1419,09	0,0523	0,000375	<0,000001
1504,36	0,0127	0,000458	0,00000817
1488,22	0,0121	0,000156	<0,000001
1638,98	0,0284	0,000159	<0,000001
1457,2	0,109	0,00443	0,0000648
3964,46	0,00000479	0,0013	0,22
2022,05	0,000681	0,0211	0,00000283
3262,46	0,000005	0,000159	0,00159
5904,22	0,0000398	0,000159	<0,000001
1519,6	0,000005	0,000159	0,531
1440,74	0,0856	0,0013	<0,000001
3301,99	0,0000541	0,0058	0,000728
1228,99	0,0541	0,0127	<0,000001

Spośród 13 pików otrzymanych dla algorytmu SNN, dla 7 z nich wykazano istotność statystyczną we wszystkich 3 testach. Są to peptydy o wartościach m/z wynoszących: 1504,36 Da, 1488,22 Da, 1638,98 Da, 2022,05 Da, 3262,46 Da, 5904,22 Da oraz 3301,99 Da.

W przypadku pozostałych 6 pików wykazano istotność statystyczną w 2 testach. Dla 2 pików o wartościach m/z wynoszących 3964,46 Da oraz 1519,6 Da

wykazano istotność statystyczną w teście t-Studenta i Wilcoxona, ale nie wykazano dla nich istotności w teście Anderson-Darling.

Dla 4 pików wykazano istotność statystyczną w teście Wilcoxona i Anderson-Darling, ale nie uzyskano dla nich istotności w teście t-Studenta. Reprezentowane są one przez fragmenty peptydów o następujących wartościach m/z: 1419,09 Da, 1457,2 Da, 1440,74 Da oraz 1228,99 Da.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu SNN

Przy zastosowaniu algorytmu SNN możliwa była identyfikacja 2 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1419,09

1504,36 – dopełniacz C3

1488,22

1638,98

1457,2

3964,46

2022,05

3262,46

5904,22

1519,6 – dopełniacz C3 (oksydacja)

1440,74

3301,99

1228,99

Po wyeliminowaniu dwóch cząsteczek o m/z wyższej niż 3500 Da, pozostało 11 fragmentów peptydów, mogących służyć jako różnicujące pacjentów z WZIG z pacjentami z grupy kontrolnej przy użyciu modelu SSN.

Dla 6 spośród nich uzyskano istotność statystyczną we wszystkich testach i uznano je za najbardziej różnicujące. Są to peptydy o następujących wartościach m/z:

1504,36 Da (fragment zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3, wykazany jako różnicujący również w algorytmie GA), **1488,22** Da (wykazany jako różnicujący również w modelu GA), **1638,98** Da (wykazany jako różnicujący również w modelu GA), **2022,05** Da, **3262,46** Da oraz **3301,99** Da.

Pozostałe 5 pików o m/z poniżej 3500 Da uzyskało istotność statystyczną w dwóch testach. W teście t-Studenta oraz Wilcoxona istotność statystyczną wykazano dla peptydu o m/z wynoszącej **1519,6** Da (fragment zidentyfikowany jako cząsteczka C3 dopełniacza po przebytej oksydacji, wykazany jako różnicujący również w modelu GA). Dla pozostałych 4 pików wykazano istotność statystyczną w teście Wilcoxona oraz Anderson-Darling. Są one reprezentowane przez fragmenty peptydów o następujących wartościach m/z: **1419,09** Da (pik wykazany jako różnicujący również w modelu GA), **1457,2** Da, **1440,74** Da oraz **1228,99** Da (pik wykazany jako różnicujący również w algorytmie GA).

4.1.3. Algorytm QC

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu QC również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** oraz **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm QC (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym)

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1488,22	0,0121	0,000156	<0,000001
1509,96	0,0328	0,000159	<0,000001
1519,6	0,000005	0,000159	0,531

3951,87	0,0000398	0,000156	0,00000288
9136,25	<0,000001	0,000156	0,0175

Wśród 5 pików zidentyfikowanych przy zastosowaniu algorytmu QC, dla 4 z nich wykazano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach. Są to piki o wartościach m/z wynoszących: 1488, 22 Da, 1509,96 Da, 3951,87 Da oraz 9136,25 Da.

Dla pików o wartości m/z równej 1519,6 Da wykazano istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxon, natomiast nie uzyskano istotności w teście Anderson-Darling.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu QC

Przy zastosowaniu algorytmu QC możliwa była identyfikacja 1 fragmentu peptydu spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1488,22

1509,96

1519,6 – dopełniacz C3 (oksydacja)

3951,87

9136,25

Po wyeliminowaniu pików o wartości m/z powyżej 3500 Da zostały 3 fragmenty peptydów, które w algorytmie QC zostały zakwalifikowane jako różnicujące pacjentów z WZIG z pacjentami z grupy kontrolnej. Dla 2 z nich wykazano istotność statystyczną we wszystkich testach, są to piki o wartościach m/z wynoszących: **1488,22** Da (zidentyfikowany jako różnicujący również w modelu GA oraz SNN) oraz **1509,96** Da.

Dla fragmentu peptydu o wartości m/z równej **1519,6** Da (fragment zidentyfikowany jako cząsteczka C3 dopełniacza biorąca udział w oksydacji, wykazany

również w modelu GA oraz SNN) uzyskano istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxon.

4.2. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na Leśniowskiego-Crohna z wynikami osób zdrowych

Liczebność próbek: 65

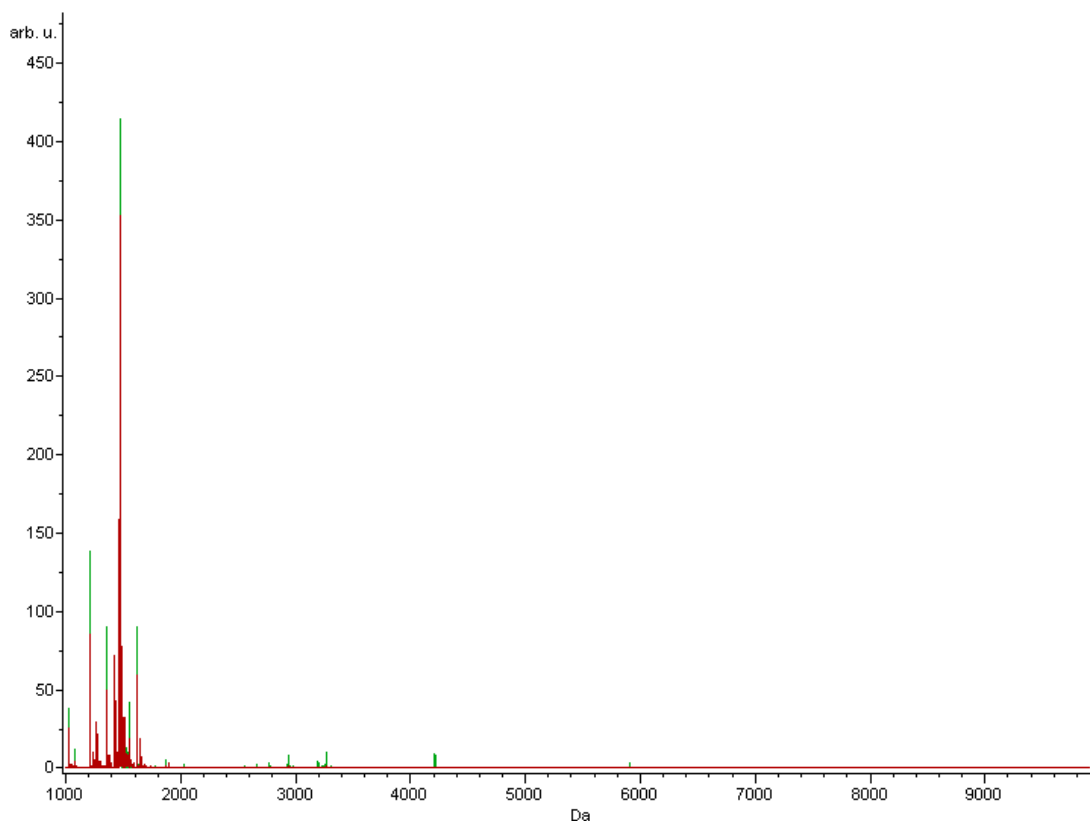
Choroba Leśniowskiego- Crohna (ChLC): 35

Grupa kontrolna (kontrola): 30

Analiza proteomiczna próbek osocza pacjentów z ChLC i osób z grupy kontrolnej również wykazała różnice w profilu białkowo-peptydowym tych grup. Najbardziej różnicujący okazał się algorytm genetyczny (GA), dla którego obliczone wartości walidacji krzyżowej, zdolności rozpoznawania oraz walidacji zewnętrznej były najwyższe.

łącznie uzyskano 81 pików.

Średnie widma masowe charakterystyczne dla tych grup ilustruje rycina 8.



Ryc. 8. Średnie widma dla grup: **ChLC**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony. Oś rzędnych- intensywność sygnału, oś odciętych – stosunek masy do ładunku elektrycznego peptydów [m/z] wyrażona w Daltonach [Da].

Raporty dla poszczególnych algorytmów ilustrują poniższe zestawienia.

Tabela 14. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **algorytmu genetycznego (GA)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	80%	100%
kontrola	100%	100%
Ogółem	90%	100%

Tabela 15. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **nadzorowanej sieci neuronowej (SNN)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	50%	100%
kontrola	100%	76,67%
Ogółem	75%	88,33%

Tabela 16. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **szybkiego klasyfikatora (QC)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	80%	80%
kontrola	96,67%	100%
Ogółem	88,33%	90%

Tabela 17. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Najwyższe wartości osiągnięto dla algorytmu **GA**.

Algorytm	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna [%]	
			ChLC	Kontrola
GA	90	100	100	100
SNN	75	88,3	100	100
QC	88,3	90	100	90

Najbardziej charakterystyczne piki (fragmenty peptydów użyte do klasyfikacji) dla każdego z prezentowanych modeli przedstawiono poniżej. Dla algorytmu GA wykryto 15 pików, natomiast 4 dla algorytmu SNN oraz 1 dla algorytmu QC. Niektóre z nich były wspólne dla dwóch algorytmów.

Tabela 18. Piki otrzymane dla algorytmów GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **ChLC** z **grupą kontrolną**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Algorytm GA	Algorytm SNN	Algorytm QC
1466,42	1419,39	1419,39
1519,65	1677,18	
2883,82	4208,86	
1488,29		
1245,08		
1677,18		
4208,86		
4230,63		
3970,78		
1261,28		
1263,89		
1617,32		
4642,62		
5336,05		
4090,29		

Istotność statystyczną pików otrzymanych dla poszczególnych algorytmów ilustrują tabele 19-21.

4.2.1. Algorytm GA

Dla wszystkich otrzymanych pików obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm GA (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxon (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1466,42	0,49	0,562	0,899
1519,65	0,0000369	0,0000491	0,52
2883,82	0,866	0,724	0,000724
1488,29	0,0071	0,0000572	$< 0,000001$
1245,08	0,21	0,15	$< 0,000001$
1677,18	0,00872	0,0000422	$< 0,000001$
4208,86	0,0000372	0,000014	0,0000013
4230,63	0,207	0,136	0,000595
3970,78	0,394	0,0339	0,0478
1261,28	0,0604	0,0417	$< 0,000001$
1263,89	0,185	0,185	0,297
1617,32	0,171	0,0115	0,762
4642,62	0,199	0,0417	0,00541
5336,05	0,00937	0,00701	0,0677
4090,29	0,0159	0,0108	0,00554

Spośród pików wykrytych przy zastosowaniu algorytmu GA dla 4 pików wykazano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach (zarówno w teście t-Studenta, jak i w teście Wilcoxon oraz Anderson- Darling). Są to piki o następujących wartościach m/z: 1488,29 Da, 1677,18 Da, 4208,86 Da oraz 4090 Da.

W przypadku pików o m/z wynoszącej 1519,65 Da oraz 5336,05 Da uzyskano istotność statystyczną w teście t- Studenta oraz Wilcoxona, natomiast nie wykazano istotności w teście Anderson- Darling.

Dla pików o m/z równym 3970,78 Da, 1261,28 Da i 4642,62 Da wykazano również istotność statystyczną w dwóch testach, tj. w teście Wilcoxona oraz Anderson- Darling, natomiast nie wykazano istotności w teście t- Studenta.

Pozostałe piki nie spełniły kryterium istotności w minimum dwóch testach.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu GA

Przy zastosowaniu algorytmu GA możliwa była identyfikacja 3 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1466,42 – łańcuch fibrynogenu alfa

1519,65 – dopełniacz C3 (oksydacja)

2883,82

1488,29

1245,08

1677,18

4208,86

4230,63

3970,78

1261,28

1263,89

1617,32 – łańcuch fibrynogenu alfa (fosforylacja)

4642,62

5336,05

4090,29

Po wyeliminowaniu pików o wartościach m/z powyżej 3500 Da, wyróżniono peptydy mogące służyć różnicowaniu pacjentów z ChLC z grupą kontrolną według

modelu GA. Za najbardziej różnicujące uznano 2 peptydy o wartościach m/z **1488,29** Da oraz **1677,18** Da, dla których uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach statystycznych. Ponadto dla 2 peptydów o masie m/z poniżej 3500 Da otrzymano istotność statystyczną w dwóch testach, które również zaklasyfikowano jako różnicujące. Są to piki o wartościach m/z **1519,65** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3) oraz **1261,28** Da.

Warto również zaznaczyć, że dla algorytmu GA otrzymano najwyższe wartości walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania, stąd też wyniki otrzymane przy pomocy tego algorytmu stanowią najwyższą wartość.

4.2.2. Algorytm SNN

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu SNN również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson-Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm SNN (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym- w tym przypadku wszystkie).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1419,39	0,00937	0,0000133	<0,000001
1677,18	0,00872	0,0000422	<0,000001
4208,82	0,0000372	0,000014	0,0000313

Wśród pików wykrytych przy zastosowaniu algorytmu SNN, dla wszystkich wykazano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach (zarówno w teście t-Studenta, jak i w teście Wilcoxon oraz Anderson- Darling). Są to piki o następujących wartościach m/z: 1419,39 Da, 1677,18 Da, 4208,86 Da. Żadnego z nich nie udało się zidentyfikować.

Po wyeliminowaniu cząsteczek o m/z wyższej niż 3500 Da, pozostały 2 fragmenty peptydów mogące służyć jako różnicujące pacjentów z ChLC z pacjentami z grupy kontrolnej przy użyciu modelu SSN. Są to piki o wartościach m/z wynoszących **1419,39** Da oraz **1677,18** Da. Dla każdego z nich uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach. Peptyd o m/z = **1677,18** Da został wykazany jako różnicujący również przy zastosowaniu modelu GA.

4.2.3. Algorytm QC

Dla piku otrzymanego przy użyciu algorytmu QC również uzyskano istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Istotność statystyczna piku wykazanego za pomocą algorytmu QC do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm QC (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym- w tym przypadku wszystkie).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxon (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1419,39	0,00937	0,0000133	<0,000001

Cząsteczka wykazana przy użyciu algorytmu QC ta spełnia kryterium masy poniżej 3500 Da oraz uzyskała istotność statystyczną we wszystkich trzech testach

jako różnicująca pacjentów z ChLC z grupą kontrolną. Nie była jednak możliwa jej identyfikacja.

Fragment peptydu o $m/z = 1419,39$ Da wykazano zatem jako różnicujący przy zastosowaniu algorytmu QC. Został on również zakwalifikowany jako różnicujący w algorytmie SNN.

4.3. Porównanie wyników analizy proteomicznej grupy chorych na chorobę Leśniowskiego- Crohna z wynikami grupy chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Liczebność grup: 65

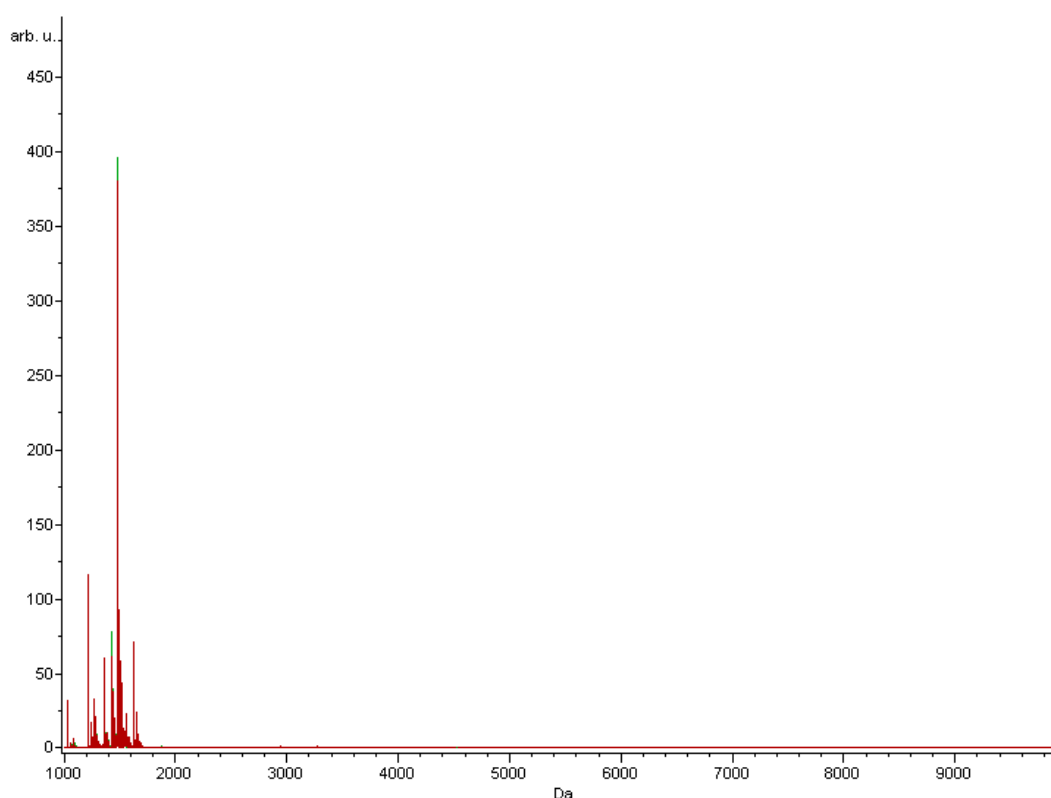
Choroba Leśniowskiego- Crohna (ChLC): 35

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG): 30

Analiza proteomiczna próbek osocza pacjentów z ChLC i WZJG również wykazała różnice w profilu białkowo – peptydowym tych grup, jednak żaden z pików wstępnie zakwalifikowanych jako różnicujący nie uzyskał istotności statystycznej w więcej niż jednym teście. Najwyższe wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania otrzymano dla algorytmu GA.

Łącznie uzyskano 70 pików.

Średnie widma charakterystyczne dla grup pacjentów z ChLC i WZJG ilustruje rycina 9.



Ryc.9. Średnie widma dla grup: **ChLC**- kolor czerwony, **WZIG**- kolor zielony. Oś rzędnych- intensywność sygnału, oś odciętych – stosunek masy do ładunku elektrycznego peptydów [m/z] wyrażona w Daltonach [Da].

Raporty dla poszczególnych algorytmów ilustrują poniższe zestawienia.

Tabela 22. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZIG**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	66,67%	91,67%
WZIG	40%	100%
Ogółem	53,33%	95,83%

Tabela 23. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	33,33%	75%
WZJG	50%	90%
Ogółem	41,67%	82,5%

Tabela 24. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
ChLC	41,67%	75%
WZJG	40%	80%
Ogółem	40,83%	77,5%

Tabela 25. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**. Najwyższe wartości walidacji krzyżowej, zdolności rozpoznawania oraz walidacji zewnętrznej osiągnięto dla algorytmu **GA**.

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna [%]	
			ChLC	WZJG
GA	53,3	95,8	92,9	66,7
SNN	41,7	82,5	64,3	66,7
QC	40,8	77,7	57,1	33,3

Najbardziej charakterystyczne piki (fragmenty peptydów użyte do wstępnej klasyfikacji) dla każdego z prezentowanych modeli przedstawiono poniżej. Dla algorytmu GA wykryto 15 pików, natomiast 23 dla algorytmu SNN oraz 19 dla algorytmu QC. Niektóre z nich były wspólne dla kilku algorytmów.

Tabela 26. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **ChLC** z **WZIG**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Algorytm GA	Algorytm SNN	Algorytm QC
1364,76	2770,17	1021,35
1538,02	1520,08	1207,6
1021,35	3280,36	1229,54
1229,54	1283,52	1245,54
5930,07	1078,35	1261,65
1078,35	1677,82	1373,56
3280,36	1546,9	1568,89
4211,9	4410,58	1585,2
4233,75	1655,85	1617,83
2661,07	1261,65	1639,82
1639,82	1585,2	1655,85
2770,17	3264,1	1661,54
1466,89	1945,2	1677,82
1245,54	1245,54	1866,38
1585,2	1866,38	1945,2
	3322,84	2022,51
	2755,99	2554,86
	2661,07	2661,07
	3303,32	2755,99
	1299,53	
	3232,56	

	2994,1	
	1441,51	

Istotność statystyczną pików otrzymanych dla poszczególnych algorytmów ilustrują tabele 27-29.

4.3.1. Algorytm GA

Dla wszystkich wyróżnionych w algorytmie GA pików obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm GA (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1364,76	0,84	0,964	0,0338
1538,02	0,84	0,879	<0,000001
1021,35	0,84	0,877	0,00684
1229,54	0,84	0,877	0,602
5930,07	0,84	0,877	0,162
1078,35	0,84	0,891	0,0338
3280,36	0,84	0,877	0,624
4211,9	0,84	0,877	0,00454

4233,75	0,84	0,877	0,0549
2661,07	0,84	0,877	0,624
1639,82	0,84	0,877	0,162
2770,17	0,84	0,877	0,00524
1466,89	0,862	0,964	0,438
1245,54	0,84	0,877	0,00514
1585,2	0,84	0,877	0,0269

Spośród wszystkich 15 pików wykazanych przy zastosowaniu algorytmu GA, dla żadnego z nich nie wykazano istotności statystycznej w teście t- Studenta ani Wilcozona. Dla 8 z nich wykazano istotność w teście Anderson-Darling. Są to piki o wartościach m/z wynoszących: 1364,76 Da, 1538,02 Da, 1021,35 Da, 1078,35 Da, 4211,9 Da, 2770,17 Da, 1245,54 Da oraz 1585,2 Da. Nie wystarcza to jednak, aby zakwalifikować je jako istotne, ponieważ spełniły ten warunek tylko w jednym z trzech testów.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu GA

Przy zastosowaniu algorytmu GA możliwa była identyfikacja 3 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1364,76

1538,02

1021,35 – łańcuch fibrynogenu alfa

1229,54

5930,07

1078,35 – łańcuch fibrynogenu alfa

3280,36

4211,9

4233,75

2661,07

1639,82

2770,17

1466,89 – łańcuch fibrynogenu alfa

1245,54

1585,2

Po wyeliminowaniu trzech pików o m/z powyżej 3500 Da, pozostało 12 fragmentów peptydów, z których 7 uzyskało istotność statystyczną w teście Anderson-Darling. Są to fragmenty peptydów o następujących wartościach m/z: 1364,76 Da, 1538,02 Da, 1021,35 Da (fragment zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa), 1078,35 Da (również zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa), 2770,17 Da, 1245,54 Da oraz 1585,2 Da.

Żaden z pików nie uzyskał istotności statystycznej w teście t-Studenta ani Wilcoxon, a tym samym żaden z nich nie spełnił warunku istotności w minimum dwóch z trzech testów.

4.3.2. Algorytm SNN

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu SNN również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson-Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxon oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm SNN (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxon (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
2770,17	0,84	0,877	0,00524

1520,08	0,891	0,988	0,0354
3280,36	0,84	0,877	0,624
1283,52	0,862	1	0,0896
1078,35	0,84	0,891	0,0338
1677,82	0,84	0,877	0,00425
1546,9	0,84	0,879	0,0223
4410,58	0,84	0,877	<0,000001
1655,85	0,84	0,877	0,00146
1261,65	0,84	0,877	0,181
1585,2	0,84	0,877	0,0269
3264,1	0,891	0,953	0,00227
1945,2	0,84	0,877	0,000296
1245,54	0,84	0,877	0,00514
1866,38	0,84	0,877	0,00202
3322,84	0,84	0,877	0,273
2755,99	0,84	0,877	<0,000001
2661,07	0,84	0,877	0,624
3303,32	0,84	0,9	0,39
1299,53	0,84	0,9	0,158
3232,56	0,84	0,877	0,162
2994,1	0,84	0,877	0,0526
1441,51	0,84	0,879	0,000183

Podobnie jak w przypadku algorytmu GA, również w algorytmie SNN dla żadnego z pików nie wykazano istotności statystycznej w teście t- Studenta ani Wilcoxon. Dla 14 z 23 pików wykazano istotność w teście Anderson-Darling. Są to

piki o wartościach m/z wynoszących: 2770,17 Da, 1520,08 Da, 1078,35 Da, 1677,82 Da, 1546,9 Da, 4410,58 Da, 1655,85 Da, 1585,2 Da, 3264,1 Da, 1945,2 Da, 1245,54 Da, 1866,38 Da, 2755,99 Da oraz 1441,51 Da.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu SNN

Przy zastosowaniu algorytmu SNN możliwa była identyfikacja 4 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

2770,17

1520,08

3280,36

1283,52

1078,35 – łańcuch fibrynogenu alfa

1677,82

1546,9

4410,58

1655,85 – inhibitor inter- alfa-trypsyny - ciężki łańcuch H4

1261,65

1585,2

3264,1

1945,2 – kininogen-1

1245,54

1866,38 – dopełniacz C3

3322,84

2755,99

2661,07

3303,32

1299,53

3232,56

2994,1

1441,51

Po wyeliminowaniu jednego pików o m/z powyżej 3500 Da, pozostały 22 fragmenty peptydów, z których 13 uzyskało istotność statystyczną w teście Anderson-Darling. Są to piki o wartościach m/z wynoszących: 2770,17 Da (wykazany również w modelu GA), 1520,08 Da, 1078,35 Da (zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa, wykazany również w modelu GA), 1677,82 Da, 1546,9 Da, 1655,85 Da (zidentyfikowany jako inhibitor inter-alfa-trypsyny-ciężki łańcuch H4), 1585,2 Da (wykazany również w modelu GA), 3264,1 Da, 1945,2 Da (zidentyfikowany jako kininogen-1), 1245,54 Da (wykazany również w modelu GA), 1866,38 Da (zidentyfikowany jako dopełniacz C3), 2755,99 Da oraz 1441,51 Da. Nie jest to jednak wystarczające, aby cząsteczki te mogły zostać zakwalifikowane jako różnicujące, ponieważ nie spełniły warunku istotności w przynajmniej dwóch testach.

4.3.3. Algorytm QC

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu QC również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 29.

Tabela 29. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm QC (wartości znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1021,35	0,84	0,87	0,00684
1207,6	0,84	0,877	0,551
1229,54	0,84	0,877	0,602
1245,54	0,84	0,877	0,00514
1261,65	0,84	0,877	0,181

1373,56	0,84	0,877	0,166
1568,89	0,84	0,877	0,00227
1585,2	0,84	0,877	0,0269
1617,83	0,84	0,877	0,0338
1639,82	0,84	0,877	0,162
1655,85	0,84	0,877	0,00146
1661,54	0,84	0,877	0,0317
1677,82	0,84	0,877	0,00425
1866,38	0,84	0,877	0,00202
1945,2	0,84	0,877	0,000296
2022,51	0,84	0,877	0,0235
2554,86	0,84	0,877	0,0834
2661,07	0,84	0,877	0,624
2755,99	0,84	0,877	<0,000001

Spośród wszystkich 19 pików wykazanych przy zastosowaniu algorytmu QC, dla żadnego z nich nie wykazano istotności statystycznej w teście t- Studenta ani Wilcoxon. Dla 12 z nich wykazano istotność w teście Anderson-Darling. Są to piki o wartościach m/z wynoszących: 1021,35 Da, 1245,54 Da, 1568,89 Da, 1585,2 Da, 1617,83 Da, 1655, 85 Da, 1661,54 Da, 1677,82 Da, 1866,38 Da, 1945,2 Da, 2022,51 Da oraz 2755,99 Da.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu QC

Przy zastosowaniu algorytmu QC możliwa była identyfikacja 9 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1021,35 – fibrynogen alfa

1207,6 – mucyna 3A

1229,54
1245,54
1261,65
1373,56
1568,89 – kininogen-1
1585,2
1617,83 – fibrynogen alfa (fosforylacja)
1639,82
1655,85 – inhibitor inter- alfa-trypsyny - ciężki łańcuch H4
1661,54
1677,82
1866,38 – dopełniacz C3
1945,2 – kininogen-1
2022,51 – dopełniacz C3
2554,86 – fibrynogen alfa
2661,07
2755,99

Wszystkie z powyższych 19 pików spełniły kryterium wartości m/z poniżej 3500 Da. Dla żadnego z nich nie wykazano istotności statystycznej w teście t-Studenta ani Wilcoxon. Dla 12 pików wykazano istotność w teście Anderson-Darling. Są to piki o wartościach m/z wynoszących: 1021,35 Da (zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa, wykazany również w modelu GA), 1245,54 Da (wykazany również w modelu GA oraz SNN), 1568,89 Da (zidentyfikowany jako kininogen-1), 1585,2 Da (wykazany również w modelu GA oraz SNN), 1617,83 Da (zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa), 1655,85 Da (zidentyfikowany jako inhibitor inter-alfa-trypsyny- ciężki łańcuch H4, wykazany również w modelu SNN), 1661,54 Da, 1677,82 Da (wykazany również w modelu SNN), 1866,38 Da (zidentyfikowany jako dopełniacz C3, wykazany również w modelu SNN), 1945,2 Da (zidentyfikowany jako kininogen-1, wykazany również w modelu SNN), 2022,51 Da oraz 2755,99 Da (wykazany również w modelu SNN).

Podobnie jak w przypadku algorytmu GA oraz SNN, również przy zastosowaniu QC również nie wykazano żadnego piku mogącego służyć za różnicujący pacjentów z ChLC z pacjentami z WZJG, ponieważ żaden nie spełnił kryterium istotności statystycznej w przynajmniej dwóch testach.

4.4. Porównanie wyników analizy proteomicznej w grupie chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit (wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub chorobę Leśniowskiego-Crohna) z wynikami w grupie kontrolnej

Liczebność próbek: 95

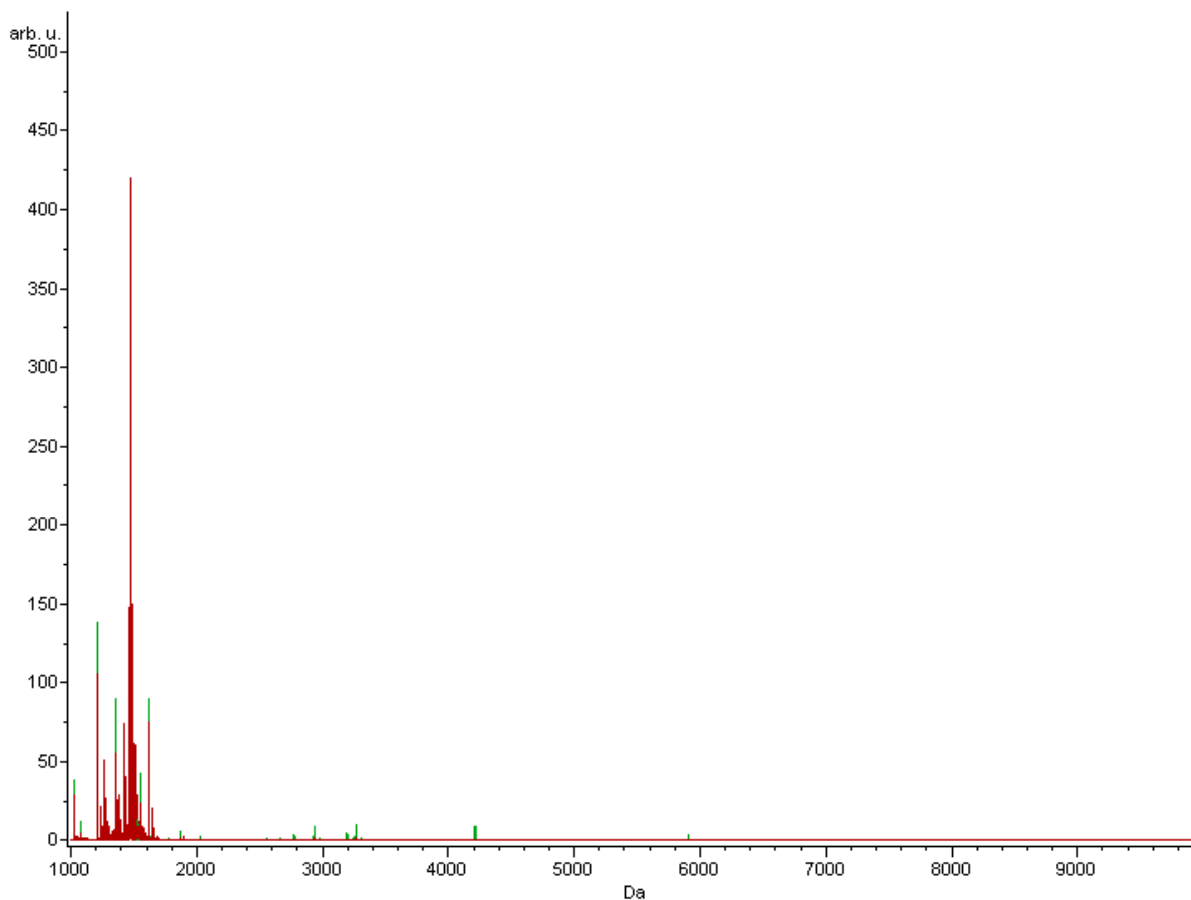
Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ): 65

Grupa kontrolna (kontrola): 30

Analiza proteomiczna próbek osocza grupy pacjentów z NChZJ (WZJG oraz ChLC) i grupy kontrolnej wykazała różnice w profilu białkowo – peptydowym umożliwiające różnicowanie tych grup. W przypadku tego porównania najbardziej różnicujący okazał się algorytm QC.

łącznie uzyskano 93 piki.

Średnie widma charakterystyczne dla grup pacjentów z NChZJ i grupy kontrolnej ilustruje rycina 10.



Ryc.10. Średnie widma dla grup: **NChZJ**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony. Oś rzędnych- intensywność sygnału, oś odciętych – stosunek masy do ładunku elektrycznego peptydów [m/z] wyrażona w Daltonach [Da].

Raporty dla poszczególnych algorytmów ilustrują poniższe zestawienia.

Tabela 30. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i **grupy kontrolnej**.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
NChZJ	80%	100%
kontrola	90%	100%
Ogółem	85%	100%

Tabela 31. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ i grupy kontrolnej.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
NChZJ	86,67%	93,33%
kontrola	93,3%	100%
Ogółem	90%	96,67%

Tabela 32. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ i grupy kontrolnej.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
NChZJ	93,33%	93,33%
kontrola	86,67%	93,33%
Ogółem	90%	93,33%

Tabela 33. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ i grupy kontrolnej. Najwyższe wartości walidacji krzyżowej, zdolności rozpoznawania i walidacji zewnętrznej osiągnięto dla algorytmu **QC**.

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna [%]	
			NChZJ	kontrola
GA	85	100	100	96,7
SNN	90	96,67	50	96,7
QC	90	93,33	100	96,7

Najbardziej charakterystyczne piki (fragmenty peptydów użyte do klasyfikacji) dla każdego z prezentowanych modeli przedstawiono poniżej. Dla algorytmu GA wykryto 15 pików, dla algorytmu SNN 23 piki, a dla algorytmu QC 13 pików. Niektóre z nich były wspólne dla kilku algorytmów.

Tabela 34. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **NChZJ** z **grupą kontrolną**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Algorytm GA	Algorytm SNN	Algorytm QC
1519,7	2022,1	1419,33
5375,12	2769,28	1488,27
1229,11	1553,53	1509,97
4090,41	9135,31	1519,7
1568,26	1519,7	1660,94
1351,27	1677,2	1677,2
1488,27	1532,05	2554,01
5336,18	4208,99	2769,28
1389,27	3191,58	2932,32
4208,99	1504,48	3191,58
4230,63	2209,63	3262,59
1435,41	9426,71	4208,99
1660,94	1896,86	5904,21
2808,89	6432,22	
1263,96	1457,37	
	1584,5	
	5904,21	
	1479,0	
	1435,41	
	1263,96	
	1526,12	
	6669,59	
	1660,94	

Istotność statystyczną pików otrzymanych dla poszczególnych algorytmów ilustrują tabele 35-37.

4.4.1. Algorytm GA

Dla wszystkich wyróżnionych w algorytmie GA pików obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 35.

Tabela 35. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm GA (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1519,7	<0,00001	<0,00001	0,29
5375,12	0,225	0,0245	0,0066
1229,11	0,0053	0,000747	<0,000001
4090,41	0,000251	0,0000667	0,000842
1568,26	0,00338	0,000313	0,000506
1351,27	0,0119	0,0434	0,00142
1488,27	0,000661	0,00000302	<0,000001
5336,18	0,000251	0,0000667	0,000842
1389,27	0,0149	0,0017	0,0000847
4208,99	0,0000453	<0,000001	<0,000001
4230,63	0,0549	0,0232	0,000276
1435,41	0,0171	0,000747	<0,00001

1660,94	0,000961	<0,000001	<0,000001
2808,89	0,0143	0,018	0,00469
1263,96	0,178	0,199	0,544

Spośród wszystkich 15 pików wykazanych przy zastosowaniu algorytmu GA, dla 11 z nich uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach (t-Studenta, Wilcoxona i Anderson-Darling). Są to piki o następujących wartościach: 1229,11 Da, 4090,41 Da, 1568,26 Da, 1351,27 Da, 1488,27 Da, 5336,18 Da, 1389,27 Da, 4208,99 Da, 1435,41 Da, 1660,94 Da oraz 2808,89 Da.

Ponadto, dla 3 peptydów uzyskano istotność statystyczną w 2 testach. Pik o wartości m/z równej 1519,7 Da był istotny statystycznie w teście t-Studenta oraz Wilcoxona, natomiast dla pików o m/z wynoszącej 5375,12 Da i 4230,63 Da otrzymano istotność statystyczną w teście Wilcoxona oraz Anderson-Darling.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu GA

Przy zastosowaniu algorytmu GA możliwa była identyfikacja 3 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1519,7 – dopełniacz C3 (oksydacja)

~~5375,12~~

1229,11

~~4090,41~~

1568,26 – kininogen-1

1351,27

1488,27

~~5336,18~~

1389,27

4208,99

4230,63

1435,41 – dopełniacz C4a

1660,94

2808,89

1263,96

Po wyeliminowaniu pięciu pików o wartościach m/z powyżej 3500 Da, pozostało 8 pików, dla których uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach i mogłyby posłużyć jako różnicujące. Są to peptydy o następujących wartościach m/z: **1435,41** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C4a), **1568,26** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka kininogenu-1), **1229,11** Da, **1351,27** Da, **1488,27** Da, **1389,27** Da, **1660,94** Da oraz **2808,89** Da.

Jako istotny uwzględnić należy również pik o masie **1519,7** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3- forma po oksydacji), dla którego wykazano istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxona.

4.4.2. Algorytm SNN

Dla wszystkich 23 pików otrzymanych przy użyciu algorytmu SNN również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 36.

Tabela 36. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm SNN (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
2022,1	0,00131	0,0017	<0,000001
2769,28	0,000134	<0,000001	<0,000001
1553,53	0,545	0,684	<0,000001
9135,31	0,298	0,00563	0,000249
1519,7	<0,000001	<0,000001	0,29
1677,2	0,00338	0,00000117	<0,000001
1532,05	0,00338	0,0000842	<0,000001
4208,99	0,0000453	<0,000001	<0,000001
3191,58	0,00000752	<0,000001	0,000398
1504,48	0,000829	0,0000059	0,0000779
2209,63	0,478	0,0471	0,00011
9426,71	0,163	0,00689	0,000216
1896,86	0,981	0,018	<0,000001
6432,22	0,126	0,00563	0,00000832
1457,37	0,00975	0,0023	0,00000389
1584,5	0,0848	0,00179	<0,000001
5904,21	0,000183	<0,000001	<0,000001
1479	0,0119	0,00252	0,000105

1435,41	0,0171	0,000747	<0,000001
1263,96	0,178	0,199	0,544
1526,12	0,000961	0,0000261	<0,000001
6669,59	0,19	0,0455	0,000306
1660,94	0,000961	<0,000001	<0,000001

Wśród powyższych 23 pików wykazanych przy zastosowaniu algorytmu SNN, dla 13 z nich uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach (t-Studenta, Wilcoxona i Anderson-Darling). Są to piki o następujących wartościach m/z: 2022,1 Da, 2769,28 Da, 1677,2 Da, 1532,05 Da, 4208,99 Da, 3191,58 Da, 1504,48 Da, 1457,37 Da, 5904,21 Da, 1479 Da, 1435,41 Da, 1526,12 Da oraz 1660,94 Da.

Ponadto, dla 8 peptydów otrzymano istotność statystyczną w dwóch testach. Pik o wartości m/z wynoszącej 1519,7 Da uzyskał istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Wilcoxona. Peptydy o wartościach m/z: 9135,31 Da, 2209,63 Da, 9426,71 Da, 1896,86 Da, 6432,22 Da, 1584,5 Da oraz 6669,59 Da były istotne statystycznie w testach Wilcoxona i Anderson- Darling.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu SNN

Przy zastosowaniu algorytmu SNN możliwa była identyfikacja 3 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

2022,1 – dopełniacz C3

2769,28

1553,53

9135,31

1519,7 – dopełniacz C3 (oksydacja)

1677,2

1532,05

4208,99

3191,58

1504,48 – dopełniacz C3

2209,63

~~9426,71~~

1896,86

~~6432,22~~

1457,37

1584,5

~~5904,21~~

1479

1435,41

1263,96

1526,12

~~6669,59~~

1660,94

Po wyeliminowaniu 6 pików o wartościach m/z powyżej 3500 Da, pozostało 11 pików, dla których uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach i można je uznać za najbardziej różnicujące pacjentów z NChZJ z przedstawicielami grupy kontrolnej według algorytmu SNN. Są to peptydy o wartościach m/z: **2022,1** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3), **2769,28** Da, **1677,2** Da, **1532,05** Da, **3191,58** Da, **1504,48** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3), **1457,37** Da, **1479** Da, **1435,41** Da, **1526,12** Da oraz **1660,94** Da.

Pozostały również 4 piki o wartości poniżej 3500 Da, dla których wykazano istotność statystyczną w dwóch testach. Pik o wartości m/z **1519,7** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3 po przebytej oksydacji) był istotny

statystycznie w teście t-Studenta oraz Wilcoxona, natomiast dla peptydów o m/z **2209,63** Da, **1896,86** Da i **1584,5** Da uzyskano istotność w teście Wilcoxona oraz Anderson-Darling.

4.4.3. Algorytm QC

Dla pików otrzymanych przy użyciu algorytmu QC również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 37.

Tabela 37. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi < 0,05 w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm QC (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson-Darling (wartość p)
1419,33	0,00151	0,00000302	<0,000001
1488,27	0,000661	0,00000302	<0,000001
1509,97	0,000961	0,00000162	<0,000001
1519,7	<0,000001	<0,000001	0,29
1660,94	0,000961	<0,000001	<0,000001
1677,2	0,00338	0,00000117	<0,000001
2554,01	0,0000119	0,00000117	0,00103
2769,28	0,000134	<0,000001	<0,000001
2932,32	0,0000643	<0,000001	0,00000267
3191,58	0,00000752	<0,000001	0,000398

3262,59	0,0000197	<0,000001	0,0000806
4208,99	0,0000453	<0,000001	<0,000001
5904,21	0,000183	<0,000001	<0,000001

Wśród wszystkich 13 pików wykazanych przy użyciu algorytmu QC, aż 12 było istotnych statystycznie we wszystkich trzech testach. Są to fragmenty peptydów o następujących wartościach m/z: 1419,33 Da, 1488,27 Da, 1509,97 Da, 1660,94 Da, 1677,2 Da, 2554,01 Da, 2769,28 Da, 2932,32 Da, 3191,58 Da, 3262,59 Da, 4208,99 Da oraz 5904,21 Da. Pik o m/z 1519,7 Da był istotnych w dwóch testach: t-Studenta i Wilcoxon.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu QC

Przy zastosowaniu algorytmu QC możliwa była identyfikacja 2 fragmentów peptydów spośród pików wstępnie zakwalifikowanych do klasyfikacji. Przedstawione wartości reprezentują stosunek m/z [Da]:

1419,33

1488,27

1509,97

1519,7 – dopełniacz C3 (oksydacja)

1660,94

1677,2

2554,01 – łańcuch fibrynogenu alfa

2769,28

2932,32

3191,58

3262,59

4208,99

5904,21

Po wyeliminowaniu peptydów o wartościach m/z wyższych niż 3500 Da, pozostało 11 istotnych statystycznie pików, które mogłyby służyć różnicowaniu pacjentów z rozpoznaniem NChZJ z grupą kontrolną na podstawie algorytmu QC. Za najbardziej różnicujące uznano peptydy, dla których uzyskano istotność statystyczną we wszystkich trzech testach. Są to cząsteczki o następujących wartościach m/z: **1419,33** Da, **1488,27** Da, **1509,97** Da, **1660,94** Da, **1677,2** Da, **2554,01** Da (zidentyfikowany jako łańcuch fibrynogenu alfa), **2769,28** Da, **2932,32** Da, **3191,58** Da oraz **3262,59** Da. Ponadto, za różnicujący uznano również pik o wartości m/z =**1519,7** Da (zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3- forma po przebytej oksydacji), dla którego otrzymano istotność statystyczną w dwóch testach.

Warto również zaznaczyć, że peptydy o wartościach m/z: **1519,7** Da oraz **1660,94** Da wykazano jako różnicujące pacjentów z NChZJ z grupą kontrolną we wszystkich trzech algorytmach: GA, SNN oraz QC.

Piki o m/z **2769,28** Da oraz **1677,2** Da wykazano jako różnicujące w algorytmie SNN oraz QC.

4.5. Porównanie wyników analizy proteomicznej pacjentów chorujących na nieswoiste choroby zapalne jelit będących w okresie zaostrzenia choroby z wynikami pacjentów będących w okresie remisji

Liczebność próbek: 65

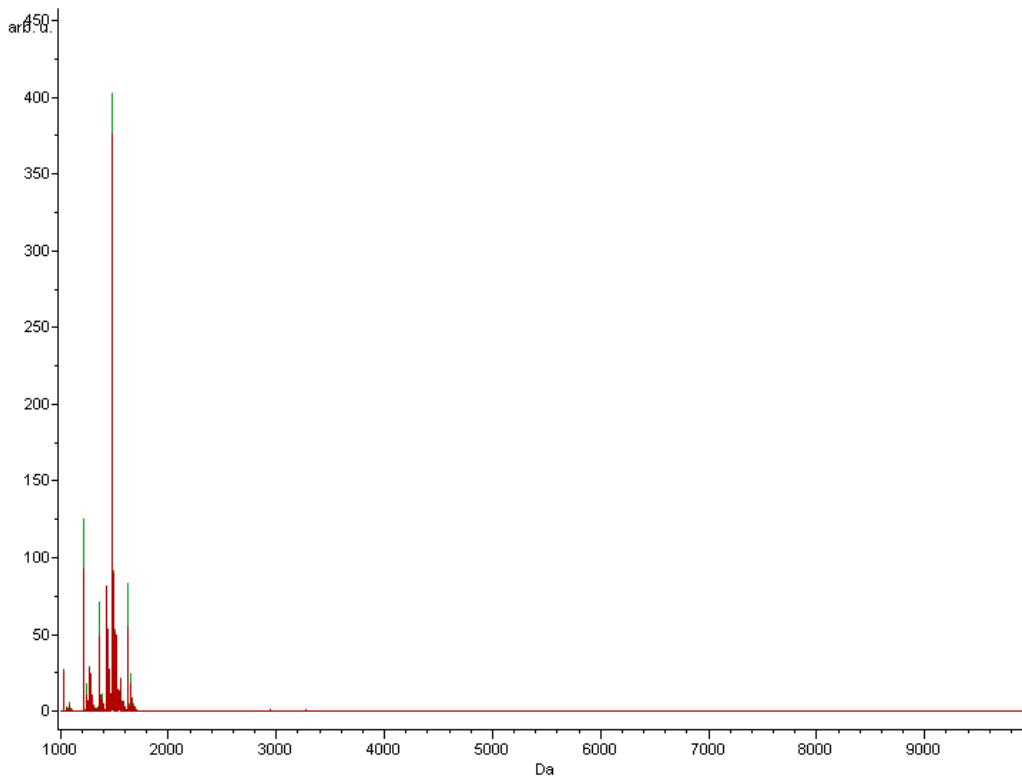
Zaostrzenie NChZJ: 48

Remisja NChZJ: 17

Analiza proteomiczna próbek osocza pacjentów z NChZJ w okresie zaostżenia choroby i pacjentów w okresie remisji NChZJ wykazała różnice w profilu białkowo-peptydowym tych grup. W przypadku tego porównania najbardziej różnicujący okazał się algorytm QC, dla którego obliczone wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania były najwyższe.

łącznie uzyskano 70 pików.

Średnie widma charakterystyczne dla grup pacjentów z NChZJ w okresie zaostżenia i remisji ilustruje rycina 11.



Ryc.11. Średnie widma dla grup: pacjenci z NChZJ w okresie **zaostżenia**- kolor czerwony, pacjenci z NChZJ w okresie **remisji**- kolor zielony. Oś rzędnych- intensywność sygnału, oś odciętych – stosunek masy do ładunku elektrycznego peptydów [m/z] wyrażona w Daltonach [Da].

Raporty dla poszczególnych algorytmów ilustrują poniższe zestawienia.

Tabela 38. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
Zaostrzenie	60%	93,33%
Remisja	14,29%	71,43%
Ogółem	37,14%	82,38%

Tabela 39. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
Zaostrzenie	6,67%	6,67%
Remisja	100%	100%
Ogółem	53,33%	53,33%

Tabela 40. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Grupa	Walidacja krzyżowa	Zdolność rozpoznawania
Zaostrzenie	66,67%	66,67%
Remisja	85,71%	100%
Ogółem	76,19%	83,33%

Tabela 41. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby. Najwyższe wartości walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania osiągnięto dla algorytmu **QC**.

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]
GA	85	100
SNN	53,33	53,33
QC	76,19	83,33

Najbardziej charakterystyczne piki (fragmenty peptydów użyte do klasyfikacji) dla każdego z prezentowanych modeli przedstawiono poniżej. Dla algorytmu GA wykryto 15 pików, natomiast 1 dla algorytmu SNN oraz 1 dla algorytmu QC.

Tabela 42. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** z pacjentami w okresie **remisji**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da]

Algorytm GA	Algorytm SNN	Algorytm QC
1078,36	1457,82	1435,88
1520,09		
1207,6		
1283,51		
1364,76		
1677,82		
1585,2		
1419,85		
1466,88		
1526,79		
2022,53		
2661,07		

1457,82		
1373,55		
2770,18		

Istotność statystyczną pików otrzymanych dla poszczególnych algorytmów ilustrują tabele 43-45.

4.5.1. Algorytm GA

Dla wszystkich pików wyróżnionych w algorytmie GA obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcozona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 43.

Tabela 43. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** i pacjentów z NChZJ w okresie **remisji** choroby. Dla wszystkich pików zastosowano test t-Studenta, Wilcozona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm GA (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcozona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1078,36	0,686	0,814	0,0505
1520,09	0,982	1	0,0373
1207,6	0,982	1	0,551
1283,51	0,982	1	0,0907
1364,76	0,982	1	0,035
1677,82	0,816	1	0,00449
1585,2	0,626	1	0,0274

1419,85	0,686	1	0,0259
1466,88	0,982	1	0,438
1526,79	0,982	1	0,0253
2022,53	0,888	1	0,0253
2661,07	0,982	1	0,624
1457,82	0,0499	0,101	0,0135
1373,55	0,982	1	0,163
2770,18	0,982	1	0,0079

Wśród 15 pików wykazanych przy użyciu algorytmu GA, tylko jeden z nich spełnił warunek istotności statystycznej. Jest to pik o m/z **1457,82** Da, który był istotny statystycznie w teście t-Studenta oraz Anderson-Darling. Został on zakwalifikowany jako różnicujący. Wszystkie powyższe cząsteczki spełniają kryterium wartości m/z < 3500 Da, ale żadnej nie udało się zidentyfikować.

4.5.2. Algorytm SNN

Dla pików otrzymanego przy użyciu algorytmu SNN również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson-Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 44.

Tabela 44. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** i pacjentów z NChZJ w okresie **remisji** choroby. Do obliczeń zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling. Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi < 0,05 w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm SNN (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1457,82	0,0499	0,101	0,0135

Pik o wartości $m/z = 1457,82$ Da wykazany w algorytmie SNN uzyskał istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Anderson-Darling, a także spełnia kryterium $m/z < 3500$ Da i został zakwalifikowany jako różnicujący. Jest to ten sam pik, który wykazano jako różnicujący również przy zastosowaniu algorytmu GA. Nie była możliwa jego identyfikacja.

4.5.3. Algorytm QC

Dla piku otrzymanego przy użyciu algorytmu QC również obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson- Darling. Wyniki przedstawiono w tabeli 45.

Tabela 45. Istotność statystyczna piku wykazanego za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** i pacjentów z NChZJ w okresie **remisji** choroby. Do obliczeń zastosowano test t-Studenta, Wilcoxona oraz Anderson – Darling.

Pik jest istotny statystycznie, gdy obliczona dla niego wartość p wynosi $< 0,05$ w przynajmniej dwóch testach.

Algorytm QC (wartości p znajdujące się w zakresie istotności statystycznej wyróżniono kolorem szarym).

m/z [Da]	Test t- Studenta (wartość p)	Test Wilcoxona (wartość p)	Test Anderson- Darling (wartość p)
1435,88	0,0499	0,101	0,0136

Pik o wartości $m/z = 1435,88$ Da wykazany w algorytmie QC uzyskał istotność statystyczną w teście t-Studenta oraz Anderson-Darling.

Identyfikacja peptydów wg algorytmu QC

Przy zastosowaniu algorytmu QC możliwa była identyfikacja fragmentu peptydu zakwalifikowanego do klasyfikacji. Przedstawiona poniżej wartość reprezentuje stosunek m/z [Da]:

1435,88 – dopełniacz C4a

Pik ten spełnia kryterium $m/z < 3500$ Da i uzyskał istotność statystyczną w teście t-Studenta i w teście Anderson- Darling przy zastosowaniu algorytmu QC. Cząsteczka peptydu o $m/z = 1435,88$ Da została zatem zidentyfikowana jako fragment dopełniacza C4a i wykazano ją jako różnicującą pacjentów z NChZJ w okresie zaostrzenia z pacjentami w okresie remisji choroby według algorytmu QC.

5. DYSKUSJA

Diagnostyka i leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit nadal pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Wraz z rozwojem cywilizacji rośnie częstość występowania tych schorzeń, a czas od pojawienia się pierwszych objawów do postawienia prawidłowego rozpoznania nadal wynosi średnio kilka lat. Wynika to między innymi z faktu, że przebieg NChZJ może być różnorodny, często nietypowy, a w początkowym stadium choroby objawy mogą być słabiej wyrażone (5, 8, 23, 138). Jak powszechnie wiadomo, zarówno WZJG jak i ChLC dotyka najczęściej ludzi młodych i aktywnych. Z uwagi na częste występowanie zaburzeń czynnościowych w tej grupie wiekowej, wielu pacjentów z NChZJ jest początkowo podejrzewana o tego rodzaju schorzenia, a dopiero przy braku skuteczności proponowanej terapii bądź przy pełniejszej manifestacji objawów, kierowani są oni na diagnostykę w kierunku NChZJ, co znacznie opóźnia wdrożenie odpowiedniej terapii. Często zdarza się również sytuacja odwrotna – wielu pacjentów z zaburzeniami o charakterze wyłącznie czynnościowym jest kierowana bezzasadnie na kolonoskopię, która nie wykazuje żadnych odchyłań. Potwierdza to, jak dużych trudności może przysparzać diagnostyka różnicowa zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego i NChZJ. Ponadto, często podczas pierwszej wizyty lekarskiej przyjmuje się, że zgłaszane przez chorego objawy zapalenia jelit mają tło wyłącznie infekcyjne, a częściowa poprawa po zastosowaniu leków przeciwdrobnoustrojowych może na pewien czas uśpić czujność zarówno lekarza, jak i pacjenta (5, 8, 108, 139-142).

Postawienie prawidłowej diagnozy w bywa utrudnione i czasochłonne również dlatego, że nie dysponujemy jednym, uniwersalnym testem diagnostycznym, który mógłby jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć rozpoznanie NChZJ. Diagnostyka WZJG oraz ChLC odbywa się na podstawie analizy całokształtu obrazu klinicznego oraz wyników badań laboratoryjnych, endoskopowych i obrazowych, a przeprowadzenie dogłębnej diagnostyki jest kosztowne oraz uciążliwe dla chorego (5, 8, 27, 124). Równocześnie trwają prace nad wynalezieniem wiarygodnych i jak najmniej inwazyjnych badań, które mogłyby posłużyć jako narzędzie do szybkiego

rozpoznawania oraz monitorowania przebiegu NChZJ. Uważa się, że wprowadzenie nowych metod diagnostycznych pozwoliłoby uprościć diagnostykę tych schorzeń, poprawić opiekę nad chorymi i ograniczyć koszty z nią związane. Skrócenie czasu potrzebnego do postawienia rozpoznania umożliwiłoby wcześniejsze wdrożenie terapii, co przekłada się w większości przypadków na lżejszy przebieg choroby, rzadsze występowanie ciężkich powikłań NChZJ oraz niższą częstotliwość hospitalizacji tych chorych (124, 142, 143). Upowszechnienie nowych, wysokoczułych testów w kierunku NChZJ pomogłoby również uniknąć narażania pacjentów na badania endoskopowe, których wykonywanie jest uciążliwe dla osób zmagających się z chorobą jelit, zarówno z uwagi na przygotowanie wymagające stosowania środków przeczyszczających, jak i mało komfortowy sam zabieg ileokolonoskopii, szczególnie w przypadku zwężeń, przetok czy aktywnych zmian zapalnych (144). Ponadto, podczas zaostrzenia choroby zapalnej jelit, wykonywanie badań endoskopowych wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań takich jak perforacja czy krwotok i powinno być ograniczone do sytuacji bezwzględnie tego wymagających. Obiecującymi metodami diagnostycznymi, które mogłyby ułatwić diagnostykę NChZJ są rozwijające się w ostatnich latach technologie „omiczne”, w tym proteomika. Analizy proteomiczne prowadzone wśród pacjentów z NChZJ dążą do lepszego zrozumienia zmian w profilu białkowo-peptydowym osób dotkniętych chorobą oraz do identyfikacji białek i peptydów charakterystycznych dla danej jednostki chorobowej lub stanu klinicznego. Najczęściej badania proteomiczne przeprowadza się porównując profil białkowy pacjentów chorych z profilem białkowym osób zdrowych. Stwarza to możliwość opracowania nowych narzędzi diagnostycznych, które w sposób dokładny i jak najmniej inwazyjny pozwoliłyby rozpoznawać i monitorować przebieg kliniczny choroby. Są to metody wysokoczułe, pozwalające na wykrycie cząsteczek białkowych występujących w ustroju w bardzo niskich stężeniach. Dąży się w ten sposób do wykrycia nowych biomarkerów charakterystycznych dla poszczególnych jednostek chorobowych. Biomarkery definiowane są jako obiektywnie mierzalne wskaźniki biologiczne, które mogą wskazywać na obecność danego schorzenia, a także służyć do oceny aktualnego stanu klinicznego. Jak jednak wcześniej wspomniano, mimo dostępności różnych będących powszechnie w użyciu badań, przez cały czas poszukuje się nowych biomarkerów, które znalazłyby zastosowanie w diagnostyce NChZJ. W przypadku tych chorób nadal bowiem brakuje wystarczająco

dokładnego, a zarazem mało inwazyjnego testu, który mógłby z większą precyzją i w krótkim czasie umożliwić postawienie właściwego rozpoznania (110, 127, 143).

W niniejszej pracy podjęto się analizy proteomicznej surowicy krwi pacjentów z rozpoznaniem WZJG, ChLC oraz grupy kontrolnej w poszukiwaniu biomarkerów, które mogłyby znaleźć zastosowanie w procesie diagnostycznym NChZJ. W tym celu dokonano porównania profilu białkowo-peptydowego następujących grup: chorych na WZJG z grupą kontrolną, chorych na ChLC z grupą kontrolną, chorych na ChLC z chorymi na WZJG oraz wszystkich chorych na NChZJ z grupą kontrolną. Ponadto, dokonano porównania proteomu pacjentów z NChZJ w okresie zaostrzenia i w okresie remisji choroby, celem zbadania zmian zachodzących w profilu proteomicznym pacjentów podczas nasilenia objawów choroby.

Podczas przeprowadzonej analizy proteomicznej surowicy krwi 30 pacjentów z rozpoznaniem WZJG oraz 30 przedstawicieli grupy kontrolnej poszukiwano peptydów, które pozwoliłyby odróżnić osoby chorujące na WZJG od zdrowych. Wykazano istotne statystycznie różnice w profilu peptydowym tych dwóch grup. Z uwagi na różny mechanizm działania algorytmów wykorzystanych do obliczeń, dla każdego z nich wykazano inne piki, a niektóre z nich były wspólne dla kilku algorytmów. W badaniu tym najbardziej różnicujący okazał się algorytm GA, dla którego obliczona walidacja krzyżowa wyniosła 81,7%, zdolność rozpoznawania 100%, a walidacja zewnętrzna 50% dla WZJG i 100% dla grupy kontrolnej. Niektóre z wykrytych z pomocą algorytmu GA pików zostały ponownie wykazane również przy pomocy pozostałych algorytmów (SNN i QC).

Analiza przy użyciu algorytmu GA wykazała 9 istotnych statystycznie pików zakwalifikowanych ostatecznie jako różnicujące grupę chorujących na WZJG z grupą kontrolną, a 4 z nich udało się zidentyfikować. Zidentyfikowane peptydy to: cząsteczka dopełniacza C3 (pik o $m/z = 1504,36$ Da, wykazany również przy pomocy algorytmu SNN), cząsteczka dopełniacza C3 po przebytej oksydacji (pik o $m/z = 1519,6$ Da wykazany również przy użyciu algorytmów SNN oraz QC) cząsteczka dopełniacza C4a (pik o $m/z = 1435,15$ Da) oraz cząsteczka kininogenu-1 (pik o $m/z = 1568,02$). Układ

dopełniacza stanowi zespół kilkudziesięciu białek występujących w osoczu oraz płynach ustrojowych i odgrywających istotną rolę w mechanizmach nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Białka dopełniacza noszą nazwy składające się z litery C oraz cyfry arabskiej oraz dodatkowo niekiedy małej litery łacińskiej. Białko dopełniacza C3 odpowiada za aktywację całego układu dopełniacza, a jego niedobór w organizmie wiąże się z występowaniem niedoboru odporności (145-147). Częsteczka dopełniacza C4a, dla której w niniejszym badaniu wykazano wyższą ekspresję w grupie pacjentów z WZJG niż wśród osób zdrowych, powstaje z rozkładu białka C4 na cząsteczkę C4a i C4b. Wspomniana cząsteczka dopełniacza C4a pełni w ustroju rolę anafilatoksyny i bierze udział w wywoływaniu reakcji anafilaktycznych w organizmie. W skład anafilatoksyn układu dopełniacza wchodzi cząsteczki: C3a, C4a i C5a (147). Kininogen-1, którego cząsteczkę również zidentyfikowano w niniejszym badaniu jako różnicującą grupę osób z rozpoznaniem WZJG z grupą kontrolną jest białkiem prekursorowym dla trzech innych: ciężkiego łańcucha kininogenu (biorącego udział w krzepnięciu krwi), lekkiego łańcucha kininogenu (o niezbadanej dotychczas funkcji) oraz dla bradykininy (będącej mediatorem reakcji zapalnej) (148, 149). Pozostałych 5 istotnych statystycznie peptydów, które wykazano jako różnicujące WZJG z grupą kontrolną nie były możliwe do identyfikacji. Reprezentowane są one przez piki o wartościach m/z: 1488,22 Da, 1638,98 Da, 1228,99 Da, 1261,15 Da oraz 1419,09 Da.

Wykazana w niniejszej pracy cząsteczka kininogenu-1 prezentowana jest w literaturze jako marker diagnostyczny raka jelita grubego. Opisali ją w swoich badaniach Wang i wsp. (150), którzy na podstawie analizy proteomicznej surowicy krwi pacjentów wykazali wspomnianą cząsteczkę kininogenu-1 jako biomarker użyteczny we wczesnej diagnostyce raka jelita grubego, a także zaawansowanej postaci gruczolaka jelita grubego. Do podobnych wniosków doszli Yu i wsp. (151), którzy z kolei w swojej pracy badawczej skupili się na pacjentach z rodzinnym występowaniem raka jelita grubego. Może to mieć uzasadnienie kliniczne, ponieważ jak powszechnie wiadomo, pacjenci chorujący na WZJG mają również wyższe ryzyko rozwoju raka jelita grubego. Nie znaleziono natomiast w dostępnym piśmiennictwie doniesień na temat bezpośredniego związku kininogenu-1 z występowaniem WZJG.

Inne badania nad proteomem w WZJG zaprezentowali Schniers i wsp. (152), którzy przeprowadzili profilowanie białkowo-peptydowe materiału pozyskanego z bioptatów tkankowych z błony śluzowej jelita grubego od 6 pacjentów z WZJG oraz od 6 zdrowych ochotników. Wykazali oni istotne różnice w profilu proteomicznym tych grup, przede wszystkim w zakresie białek z rodziny S-100, których ekspresja była wyższa u osób chorych. Podobne prace badawcze przeprowadzili Bennike i wsp. (153), którzy poddali analizie proteomicznej materiał tkankowy z jelita grubego pobrany od 10 pacjentów z rozpoznaniem WZJG oraz od 10 osób zdrowych. Wykazali oni laktotransferynę jako białko najbardziej różnicujące dla tych grup i wykazujące znacznie wyższą ekspresję u pacjentów chorujących na WZJG. Badania te miały na celu przede wszystkim zrozumienie patomechanizmu choroby na poziomie białek i peptydów. Nie mogą one jednak posłużyć jako alternatywa diagnostyczna dla badania histopatologicznego, ponieważ są kosztowne i czasochłonne, wymagają również pobrania materiału z jelita podczas kolonoskopii.

Kolejnym etapem niniejszej pracy doktorskiej była próba wykrycia peptydów pomocnych w różnicowaniu ChLC z osobami zdrowymi. Zastosowana w tym celu analiza proteomiczna surowicy krwi 35 pacjentów z rozpoznaniem ChLC oraz 30 osób zdrowych również potwierdziła obecność istotnych statystycznie różnic w profilu białkowo-peptydowym tych dwóch grup. Za najbardziej różnicujący uznano algorytm GA, ponieważ uzyskał on najwyższe wartości walidacji krzyżowej (90%), zdolności rozpoznawania (100%) oraz walidacji zewnętrznej (100% dla ChLC oraz również 100% dla grupy kontrolnej).

Przy zastosowaniu algorytmu GA wyróżniono 4 istotne statystycznie piki mogące służyć różnicowaniu tych dwóch grup. Jeden z wykrytych peptydów, o $m/z = 1519,65$ Da został zidentyfikowany jako cząsteczka białka dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji). Warto przypomnieć, że niniejsza cząsteczka została również wykazana jako różnicująca WZJG z grupą kontrolną. Może to wynikać z faktu, że ChLC oraz WZJG mają zbliżony patomechanizm oraz niektóre zmiany zachodzące w proteomie tych dwóch podtypów NChZJ mogą być podobne. Dla pozostałych trzech

peptydów wykazanych jako różnicujące przy pomocy algorytmu GA nie była możliwa jednoznaczna identyfikacja. Są to piki o m/z wynoszących: 1488,29 Da, 1677,18 Da oraz 1261,28 Da. Jeden z nich, o m/z 1677,18 Da został również wykazany przy użyciu algorytmu SNN.

Podobne analizy przeprowadzone zostały przez Nanni i wsp. (154), którzy poddali profilowaniu białkowo-peptydowemu próbki surowicy krwi pobrane od 15 pacjentów z rozpoznaniem ChLC oraz od 48 zdrowych ochotników. Wykazali oni również cząsteczkę dopełniacza C3 jako różnicującą te dwie grupy, co pozostaje w zgodzie z wynikami niniejszej pracy. Badacze ci wymieniają także łańcuch fibrynogenu alfa jako jeden ze zidentyfikowanych peptydów różnicujących ChLC oraz grupę kontrolną. Peptyd ten został również zidentyfikowany przy użyciu algorytmu GA w niniejszej pracy doktorskiej, jednakże nie uzyskał on wymaganej istotności statystycznej. Nieco inne badanie przeprowadzili Vaiopoulou i wsp. (118), którzy poddali analizie proteomicznej 24 pacjentów z ChLC, przy czym 12 z nich reprezentowało populację dorosłą, a 12 pediatryczną. Wykazali oni klasterynę jako białko charakteryzujące populację dorosłą z ChLC, natomiast ceruroplazminę oraz apolipoproteinę B-100 jako białka o zwiększonej ekspresji w grupie pediatrycznej z rozpoznaniem ChLC.

Podczas przeprowadzonej w ramach niniejszej pracy doktorskiej analizy proteomicznej surowicy krwi wśród 35 pacjentów z rozpoznaniem ChLC oraz 30 chorujących WZJG podjęto się próby poszukiwania biomarkerów umożliwiających różnicowanie tych dwóch chorób. Za najbardziej różnicujący uznano algorytm GA, dla którego walidacja krzyżowa wyniosła 53,3%, zdolność rozpoznawania 95,8%, a walidacja zewnętrzna 92,9 % dla ChLC oraz 66,7% dla WZJG. W pozostałych algorytmach uzyskano niższe wartości.

Przy zastosowaniu algorytmu GA wstępnie wykazano 7 fragmentów peptydów wstępnie zaklasyfikowanych jako różnicujące, ale uzyskały one istotność statystyczną jedynie w teście Anderson-Darling, nie spełniły zatem warunku istotności w minimum dwóch z trzech zastosowanych testów. Dwa z wykazanych w teście Anderson-Darling

pików (o $m/z = 1021,35$ Da oraz o $m/z 1078,35$ Da) zidentyfikowano jako cząsteczki łańcucha fibrynogenu alfa, który jest częścią składową fibrynogenu- białka biorącego udział w krzepnięciu krwi. Łańcuch fibrynogenu alfa odgrywa również rolę w aktywacji procesów zapalnych (155, 156). Cząsteczka łańcucha fibrynogenu alfa została także wykryta w niniejszej analizie przy zastosowaniu algorytmu SNN oraz QC, ale również w tych algorytmach była istotna statystycznie jedynie w teście Anderson-Darling, nie spełniła zatem kryterium istotności statystycznej. Wspomniana wcześniej praca Nanni i wsp. (154) wymienia natomiast cząsteczkę łańcucha fibrynogenu alfa jako różnicującą ChLC z osobami zdrowymi.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej nie wykazano zatem istotnych statystycznie różnic między profilem białkowo-peptydowym pacjentów z ChLC a pacjentów z WZJG. Prawdopodobnie wynika to z niewielkich różnic w proteomie tych dwóch grup, a wykazanie ewidentnie różnicujących pików wymagałoby szerszych badań. Pozostaje to w zgodzie z pracą zaprezentowaną przez Korolkova i wsp. (157), która na podstawie badań surowicy krwi pobranej od 25 chorych z WZJG, 28 z ChLC oraz 30 osób z grupy kontrolnej wykazała brak charakterystycznych biomarkerów umożliwiających różnicowanie tych dwóch podtypów NChZJ. Do podobnych wniosków doszli Di Narzo i wsp. (158), którzy poddali profilowaniu białkowo-peptydowemu próbki osocza pobrane od 42 pacjentów z ChLC oraz 46 pacjentów z WZJG i na podstawie przeprowadzonych badań wykazali brak istotnych różnic w profilu proteomicznym tych grup.

Próby różnicowania ChLC z WZJG na podstawie analizy proteomicznej podjęli się również Subramanian i wsp. (159), którzy przeprowadzili profilowanie białkowo-peptydowe surowicy krwi u 62 pacjentów z ChLC oraz 48 z WZJG z użyciem techniki spektrometrii mas SELDI-TOF MS (ang. *surface enhanced laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). Zidentyfikowali oni następujące cząsteczki białek, które potencjalnie mogłyby służyć jako różnicujące pomiędzy podtypami NChZJ: inhibitor inter-alfa-trypsyny 4, apolipoproteinę C1 oraz czynnik płytkowy 4 (PF4). Badacze podkreślili jednak, że potwierdzenie ich przydatności klinicznej wymaga dalszych badań.

Hatsugai i wsp. (160) celem opracowania wiarygodnego modelu diagnostycznego pozwalającego różnicować ChLC i WZJG poddali analizie proteomicznej jednojądrowe komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cell proteins* – PBMC), do których zalicza się limfocyty T, limfocyty B i limfocyty NK oraz monocyty. Komórki te pozyskane były od 13 chorych z ChLC oraz 17 z WZJG, a badaczom udało się zidentyfikować 7 białek mogących potencjalnie służyć w przyszłości różnicowaniu tych grup. Z uwagi jednak na małe grupy badane, wskazane są szersze analizy w tym kierunku.

M'Koma i wsp. (161) udowodnili natomiast różnice w profilu proteomicznym preparatów histopatologicznych błony śluzowej oraz podśluzowej pobranych od 43 pacjentów z WZJG oraz 37 pacjentów z ChLC. Wykazali oni również różnice w proteomie błony śluzowej pacjentów z aktywnym zapaleniem w porównaniu z pacjentami będącymi w remisji. Podobne badanie, ale z udziałem mniejszej grupy chorych zaprezentowane zostało przez Skhoda i wsp. (130), którzy poddali analizie proteomicznej preparaty pooperacyjne z nabłonka jelita od 18 pacjentów: 6 z nich było poddanych resekcji jelita z powodu WZJG, 6 z powodu ChLC oraz 6 z powodu raka jelita grubego. Wyodrębnili oni 4 cząsteczki białkowe, które wykazywały różną ekspresję w zależności od jednostki chorobowej.

Celem niniejszej pracy było również wykazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilem białkowo-peptydowym całej grupy badanej osób chorujących na NChZJ (WZJG lub ChLC) a profilem białkowo-peptydowym grupy kontrolnej. Mogłoby to posłużyć w przyszłości jako narzędzie do diagnostyki różnicowej pomiędzy obecnością NChZJ a jej brakiem. Przeprowadzono analizę proteomiczną surowicy krwi 65 pacjentów z rozpoznaniem NChZJ (30 z WZJG oraz 35 z ChLC) oraz 30 przedstawicieli grupy kontrolnej, na podstawie której wykazano istotne statystycznie różnice w profilu białkowo-peptydowym tych grup. Najbardziej różnicujący w tym porównaniu okazał się algorytm QC, aczkolwiek dla pozostałych algorytmów również wykazano wysokie wartości. Dla algorytmu QC walidacja krzyżowa wyniosła 90%, zdolność rozpoznawania 93,33%, walidacja zewnętrzna 100% dla NChZJ oraz 96,7% dla grupy kontrolnej.

Analiza z zastosowaniem algorytmu QC wykazała 11 istotnych statystycznie pików, które mogłyby być przydatne w różnicowaniu pacjentów z NChZJ z grupą kontrolną, a dwa z nich udało się zidentyfikować. Fragment peptydu o $m/z = 1519,7$ Da zidentyfikowano jako cząsteczkę dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji) – pik ten wykazano również przy zastosowaniu algorytmu GA oraz SNN, można go zatem uznać za najbardziej różnicujący. Drugi zidentyfikowany pik różnicujący te dwie grupy o $m/z = 2554,01$ Da reprezentuje cząsteczkę łańcucha fibrynogenu alfa. Obydwie wykazane cząsteczki peptydów pełnią ważną rolę w aktywacji procesów zapalnych. Pozostałe, niemożliwe do identyfikacji fragmenty peptydów wykazane jako różnicujące dla algorytmu QC reprezentowane są przez piki o następujących wartościach m/z : 1419,33 Da, 1488,27 Da, 1509,97 Da, 1660,94 Da (wykazany również w pozostałych algorytmach: GA oraz SNN), 1677,2 Da (wykazany również przy użyciu algorytmu SNN), 2769,28 Da (wykazany również w algorytmie SNN), 2932,32 Da, 3191,58 Da oraz 3262,59 Da. Warto przypomnieć, że cząsteczka dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji) została zidentyfikowana w niniejszej pracy również jako różnicująca grupę z WZJG z grupą kontrolną, a także grupę z ChLC z grupą kontrolną. Na tej podstawie można przypuszczać, że cząsteczka dopełniacza C3 mogłaby w przyszłości znaleźć zastosowanie jako potencjalny biomarker potwierdzający lub wykluczający rozpoznanie NChZJ.

Warto nadmienić, że cząsteczka łańcucha fibrynogenu alfa, którą wykazano w niniejszym badaniu jako różnicującą NChZJ z grupą kontrolną, została również zidentyfikowana w poprzednich analizach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy: wstępnie zaklasyfikowano ją jako różnicującą ChLC z grupą kontrolną, a także ChLC z WZJG - w analizach tych nie uzyskała jednak wymaganej istotności statystycznej. Dopiero w przypadku porównania całej grupy pacjentów z NChZJ z grupą osób zdrowych, spełniła ona kryterium istotności statystycznej jako cząsteczka różnicująca te dwie grupy osób. Jest to częściowo zgodne z przytaczanymi wcześniej wynikami badań Nanni i wsp. (154), którzy wykazali cząsteczkę łańcucha fibrynogenu alfa jako różnicującą pacjentów z ChLC z grupą kontrolną. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast badań prezentujących porównanie profilu proteomicznego pacjentów z NChZJ traktowanych jako jedna grupa badana z profilem

proteomicznym osób zdrowych. Analizy takie mogłyby być natomiast przydatne do diagnostyki przesiewowej NChZJ i pozwoliłyby na wyodrębnienie chorych na dowolny podtyp NChZJ, różnicując ich z pacjentami zdrowymi bądź prezentującymi zaburzenia innego typu (np. czynnościowe). Wówczas chorzy z rozpoznaniem NChZJ trafialiby pod ukierunkowaną opiekę, a osoby z wynikiem negatywnym mogłyby uniknąć niepotrzebnych dalszych badań.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto również próbę udowodnienia możliwości zastosowania metod proteomicznych do oceny stanu klinicznego pacjentów chorujących na NChZJ. W tym celu zastosowano analizę proteomiczną surowicy krwi 48 pacjentów będących w okresie zaostrzenia NChZJ oraz 17 pacjentów w okresie remisji choroby. Nie było możliwe przeprowadzenie osobnych analiz dla ChLC oraz WZJG podczas zaostrzenia i remisji, ponieważ grupy chorych będących w remisji byłyby zbyt małe. Dokonano natomiast porównania proteomu wszystkich pacjentów z NChZJ w okresie zaostrzenia choroby z proteomem wszystkich chorych będących w okresie remisji NChZJ. Przeprowadzone badanie wykazało pewne różnice w profilu białkowo-peptydowym tych grup. Za najbardziej różnicujący uznano algorytm QC, dla którego wartość walidacji krzyżowej wyniosła 76,2%, a zdolność rozpoznawania 83,3%. Wartości walidacji zewnętrznej nie były możliwe do obliczenia z uwagi na zbyt małą liczbę próbek pozyskanych od pacjentów w okresie remisji.

Przy zastosowaniu algorytmu QC wykazano jeden istotny statystycznie pik zakwalifikowany jako różnicujący grupę pacjentów z zaostrzeniem z grupą pacjentów w okresie remisji NChZJ. Jest nim cząsteczka peptydu o $m/z = 1435,88$ Da, którą zidentyfikowano jako cząsteczkę dopełniacza C4a. Białko to pełni w organizmie rolę anafilatoksyny i wykazuje znacznie wyższą ekspresję w grupie chorych będących w okresie zaostrzenia choroby, co również świadczy o jego roli w mechanizmie reakcji zapalnych. Wskazane są jednak dalsze badania w tym kierunku, z udziałem większej ilości chorych. Dokładniejsze poznanie zmian, które zachodzą w profilu proteomicznym pacjentów w okresie zaostrzenia NChZJ prawdopodobnie umożliwi w przyszłości z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć przebieg choroby. Można również

przypuszczać, że wykrycie zmian zachodzących w organizmie na poziomie proteomicznym jeszcze przed pojawieniem się pełnej manifestacji objawów klinicznych pozwoliłoby w wielu przypadkach zmienić bieg choroby i uniknąć zaostrzenia poprzez odpowiednio wczesną intensyfikację terapii.

Dostępne prace dotyczące różnic w profilu proteomicznym pacjentów w stadium zaostrzenia i remisji choroby dotyczą przede wszystkim zmian w proteomie chorych w odpowiedzi na zastosowaną terapię. Mają one za zadanie ocenę skuteczności leczenia i dotyczą tej samej grupy pacjentów poddawanej analizie proteomicznej przed i po zastosowaniu leczenia mającego na celu indukcję remisji. Badania pilotażowe w tym kierunku przeprowadził Meuis i wsp. (162), poddając analizie proteomicznej z zastosowaniem metody SELDI-TOF MS surowicę krwi pozyskaną od 20 pacjentów z ChLC, przed leczeniem oraz po indukcji remisji z użyciem infliksimabu (IFX). Badacze ci wykazali, że czynnik płytkowy 4 (PF4) jest potencjalnym markerem dobrej odpowiedzi na terapię z zastosowaniem IFX. Podobne badania przeprowadzili Gazouli i wsp. (163), którzy również podjęli się analizy profilu proteomicznego surowicy krwi pacjentów z zaostrzeniem ChLC przed rozpoczęciem leczenia IFX oraz po indukcji remisji z użyciem tego leku. W swojej pracy zastosowali technikę MALDI-TOF MS i poddali analizie próbki pobrane od 18 pacjentów. Badacze ci dowiedli, że uzyskanie remisji znajduje odzwierciedlenie w profilu proteomicznym tych pacjentów. Wykazali oni 4 białka ściśle korelujące z remisją, do których należą: α -2-glikoproteina, białko wiążące witaminę D, α -1B-glikoproteina oraz cząsteczka dopełniacza C1r. Powyższe badania są niewątpliwie obiecującym narzędziem diagnostycznym, które może być przydatne do monitorowania skuteczności leczenia pacjentów z NChZJ poddawanych terapiom biologicznym.

Wyniki analiz proteomicznych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej mają na celu wskazanie dalszych kierunków badań zmierzających do wykrycia nowych biomarkerów przydatnych w diagnostyce oraz ocenie przebiegu WZJG i ChLC. Ostateczna ocena przydatności proteomiki jako narzędzia służącego do wczesnego rozpoznawania NChZJ oraz monitorowania stanu klinicznego pacjentów z

rozpoznanie tych chorób niewątpliwie wymaga przeprowadzenia szerszych analiz z udziałem większej grupy pacjentów. Kontynuacja badań zmierzających do określenia proteomu charakterystycznego dla WZJG i ChLC zapewne pomogłaby w opracowaniu nowych strategii diagnostycznych w tych chorobach, na czym skorzystałoby zarówno pacjenci jak i sprawujący nad nimi opiekę lekarze.

6. WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Zastosowana analiza proteomiczna surowicy krwi jest obiecującym narzędziem w poszukiwaniu biomarkerów nieswoistych chorób zapalnych jelit. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że choroby te wywołują zmiany w profilu proteomicznym surowicy krwi.
2. Wykazano 9 istotnych statystycznie pików różnicujących grupę pacjentów chorujących na WZJG z grupą kontrolną, a dla 4 z nich możliwa była identyfikacja. Jeden z wykrytych peptydów, zidentyfikowany jako cząsteczka dopełniacza C3 po przebytej oksydacji, został wykazany również jako pik różnicujący grupę z ChLC z grupą kontrolną, co można tłumaczyć podobnym patomechanizmem tych chorób. Peptydy wykazane jako różnicujące pacjentów z WZJG oraz osoby zdrowe to: cząsteczka dopełniacza C3, cząsteczka dopełniacza C4a oraz cząsteczka kininogenu-1. Mogłyby one znaleźć zastosowanie jako biomarkery przydatne we wczesnym rozpoznawaniu WZJG.
3. Przeprowadzone badania potwierdziły również istotne różnice między proteomem pacjentów z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego- Crohna a profilem białkowym osób zdrowych. Wykazano 4 istotne statystycznie piki mogące służyć różnicowaniu tych dwóch grup, a jeden z nich udało się zidentyfikować jako cząsteczkę dopełniacza C3 po przebytej oksydacji. Analizy proteomiczne mogłyby w przyszłości posłużyć również jako nieinwazyjne narzędzia diagnostyczne w ChLC.
4. Na podstawie przeprowadzonych analiz nie udowodniono istotnych statystycznie różnic w profilu proteomicznym surowicy krwi pomiędzy grupą pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna a grupą pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Należy to tłumaczyć podobnym

patomechanizmem tych chorób oraz procesami zapalnymi zachodzącymi w ich przebiegu.

5. Wykazano 11 istotnych statystycznie pików różnicujących proteom surowicy krwi pacjentów z rozpoznaniem nieswoistej choroby zapalnej jelit (ChLC lub WZJG) z proteomem surowicy krwi grupy kontrolnej. Dwa z nich były możliwe do zidentyfikowania: cząsteczka dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji) i cząsteczka łańcucha fibrynogenu alfa. Piki różnicujące profil proteomiczny chorych na NChZJ z proteomem osób zdrowych są reprezentowane przez peptydy, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako szybkie i mało inwazyjne narzędzie diagnostyczne służące do diagnostyki w kierunku NChZJ.
6. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykryto jeden istotny statystycznie pik zakwalifikowany jako różnicujący grupę pacjentów z rozpoznaniem nieswoistej choroby zapalnej jelit w okresie zaostrzenia z grupą pacjentów w okresie remisji choroby. Jest on reprezentowany przez cząsteczkę dopełniacza C4a. Wykazano, że zastosowanie analiz proteomicznych jest również obiecującym narzędziem w monitorowaniu przebiegu klinicznego NChZJ i prowadzi do wyodrębnienia białek mogących służyć jako biomarkery świadczące o zaostrzeniu bądź remisji choroby.

7. STRESZCZENIE

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC) to dwa główne podtypy nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ). Schorzenia te charakteryzuje przewlekły proces zapalny przewodu pokarmowego oraz przebieg z okresami zaostrzeń i remisji. Patogeneza tych chorób jest wieloczynnikowa i nie do końca poznana, a biorą w niej udział czynniki immunologiczne, genetyczne i środowiskowe. Schorzenia te najczęściej dotyczą ludzi młodych, a w ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości zachorowań na NChZJ. Proces diagnostyczny tych chorób jest czasochłonny, a rozpoznanie stawiane jest na podstawie całokształtu obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych, obrazowych, endoskopowych i histopatologicznych.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu nowych biomarkerów NChZJ, czyli obiektywnie mierzalnych wskaźników biologicznych występujących w płynach ustrojowych lub tkankach, które umożliwiłyby rozpoznanie choroby w sposób szybki, wiarygodny i minimalnie inwazyjny. Obiecującą dziedziną nauki jest proteomika kliniczna, która zajmuje się badaniem proteomu, czyli profilu białkowo-peptydowego w komórkach i tkankach oraz oceną zmian zachodzących w proteomie podczas choroby. Badania te umożliwiają wykrycie cząsteczek występujących bardzo niskich stężeniach, co nie jest wykonalne przy zastosowaniu tradycyjnych badań laboratoryjnych. Materiałem biologicznym wykorzystywanym najczęściej do analiz proteomicznych jest: osocze, mocz, ślina lub kał. Poprzez analizę proteomu osób chorych oraz zdrowych, dąży się do wykrycia markerów biologicznych danych chorób.

Celem niniejszej pracy była analiza proteomiczna surowicy krwi pacjentów z rozpoznaniem WZJG, ChLC oraz grupy kontrolnej w poszukiwaniu biomarkerów mogących znaleźć zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu klinicznego NChZJ. Badaniem objęto 95 osób hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii, Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, spośród których 30 miało rozpoznanie WZJG, 35 ChLC, a 30 stanowiło grupę kontrolną. Spośród osób chorych wyodrębniono również grupę 48 pacjentów w okresie zaostrzenia i 17 w okresie remisji choroby. Pobrane od pacjentów próbki

surowicy krwi poddano analizie proteomicznej za pomocą spektrometru mas MALDI-TOF/TOF, a następnie porównano ze sobą poszczególne grupy w poszukiwaniu cząsteczek je różnicujących. Do tego celu wykorzystano wielowymiarową analizę statystyczną.

Przeprowadzone badania wykazały, że WZJG i ChLC powodują istotne zmiany w profilu proteomicznym surowicy krwi pacjentów. Identyfikacja cząsteczek peptydów pozwalających na różnicowanie osób chorych z grupą kontrolną może znaleźć szerokie zastosowanie w procesie diagnostycznym NChZJ.

Wykryto 9 istotnych statystycznie pików różnicujących grupę chorych z WZJG z grupą kontrolną, spośród których 4 udało się zidentyfikować. Są to: cząsteczka dopełniacza C3 po przebytej oksydacji o $m/z = 1519,7$ Da, cząsteczka dopełniacza C3 o $m/z = 1504,36$ Da, cząsteczka dopełniacza C4a o $m/z = 1435,15$ Da oraz cząsteczka kininogenu-1 o $m/z = 1568,02$ Da. Pozostałe piki różnicujące WZJG z grupą kontrolną reprezentują peptydy o m/z : 1488,22 Da, 1638,98 Da, 1228,99 Da, 1261,15 Da oraz 1419,09 Da.

Wykazano 4 istotne statystycznie piki mogące służyć różnicowaniu ChLC z grupą kontrolną, a jeden z wykrytych peptydów o $m/z = 1519,65$ Da został zidentyfikowany jako cząsteczka białka dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji). Pozostałe peptydy wykazane jako różnicujące te dwie grupy to cząsteczki o m/z wynoszących: 1488,29 Da, 1677,18 Da oraz 1261,28 Da.

Nie udowodniono natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilem proteomicznym pacjentów z WZJG a pacjentów z ChLC.

W analizie porównującej proteom wszystkich chorych z NChZJ z grupą osób zdrowych wykazano 11 istotnych statystycznie pików różnicujących, spośród których zidentyfikowano cząsteczkę dopełniacza C3 (forma po przebytej oksydacji) o $m/z = 1519,7$ Da i cząsteczkę łańcucha fibrynogenu alfa o $m/z = 2554,01$ Da.

Ponadto wykazano 1 pik różnicujący pacjentów z NChZJ w okresie zaostrzenia choroby z pacjentami w okresie remisji. Jest on reprezentowany przez cząsteczkę dopełniacza C4a o $m/z = 1435,88$ Da.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że w przebiegu NChZJ zachodzą zmiany w profilu proteomicznym surowicy krwi pacjentów, co może zostać wykorzystane w opracowaniu nowych, minimalnie inwazyjnych testów

umożliwiających postawienie prawidłowego rozpoznania. Wykazane w niniejszej pracy istotne różnice w proteomie osób chorych i zdrowych wskazują na możliwość zastosowania tych metod w praktyce klinicznej. Analizy proteomiczne są obiecującym narzędziem w poszukiwaniu swoistych biomarkerów przydatnych zarówno w diagnostyce, jak i monitorowaniu przebiegu klinicznego WZJG i ChLC.

8. SUMMARY

Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD) are the two main subtypes of inflammatory bowel disease (IBD). These diseases are characterized by a chronic inflammatory process of the gastrointestinal tract and a course with periods of exacerbation and remission. The pathogenesis of these diseases is multifactorial and not fully understood, involving immunological, genetic and environmental factors. These diseases most often affect young people and in recent years an increase in the incidence of IBD is observed. The diagnostic process of these diseases is time-consuming and the diagnosis is made on the basis of the overall clinical picture, the results of laboratory, imaging, endoscopic and histopathological tests.

In recent years, a lot of attention has been devoted to the search for new IBD biomarkers, i.e. objectively measurable biological indicators occurring in body fluids or tissues that would allow the diagnosis of the disease in a quick, reliable and minimally invasive manner. A promising field of science is clinical proteomics, which deals with the study of the proteome, i.e. the protein-peptide profile in cells and tissues, involving assessment of changes that occur in the proteome during illness. These tests enable the detection of very low concentrations of molecules, which is not feasible using traditional laboratory tests. The biological material most commonly used for proteomic analyzes is plasma, urine, saliva or feces. Through the proteome analysis of sick and healthy people, the aim is to detect biological markers of the diseases.

The aim of this study was the proteomic analysis of the blood serum of patients diagnosed with UC, CD and a control group in the search for biomarkers that could be used in the diagnosis and monitoring of the clinical course of the IBD. The study involved 95 people hospitalized in the Department of Gastroenterology, Internal Diseases, Metabolic Diseases and Nutrition of the Medical University of Poznań, of which 30 were diagnosed with UC, 35 with CD and 30 were controls. A group of 48 patients in the exacerbation period and 17 in the remission period was distinguished from the all of the IBD patients. Serum samples taken from patients were subjected to proteomic analysis using a MALDI-TOF/ TOF mass spectrometer, and then individual

groups were compared in search of molecules that differentiate them. For this purpose, multi-dimensional statistical analysis was used.

The study showed that both UC and CD cause significant changes in the proteomic profile of patients' blood serum. Identification of peptide molecules that allow differentiation between IBD and control group can be widely used in the diagnostic process of UC and CD.

Nine statistically significant peaks were detected as discriminative between UC patients and control group, of which 4 were identified. These are: C3 complement molecule after oxidation with $m/z = 1519,7$ Da, C3 complement molecule with $m/z = 1504,36$ Da, C4a complement molecule with $m/z = 1435,15$ Da and kininogen-1 molecule of $m/z = 1568,02$ Da. The remaining detected peaks differentiating UC with the control group represent peptides of m/z : 1488,22 Da, 1638,98 Da, 1228,99 Da, 1261,15 Da and 1419,09 Da.

There were 4 statistically significant peaks that could serve to differentiate CD from the control group. One of the detected peptides of $m/z = 1519,65$ Da was identified as the C3 complement protein molecule (form after oxidation). The remaining peptides differentiating these two groups are molecules of following m/z values: 1488,29 Da, 1677,18 Da and 1261,28 Da.

However, no statistically significant differences between the proteomic profile of patients with UC and CD patients were demonstrated.

An analysis comparing the proteome of all IBD patients with a group of healthy people showed 11 statistically significant discriminative peaks, among which the complement C3 molecule (form after oxidation) of $m / z = 1519,7$ Da and the fibrinogen alpha chain molecule of $m/z = 2554, 01$ Da were identified.

In addition, 1 discriminative peak between patients during the exacerbation of IBD and patients in remission was detected. It is represented by the complement molecule C4a of $m/z = 1435, 88$ Da.

Based on the conducted research, it has been shown that changes in the proteomic profile of patients' blood serum occur in the course of IBD, which can be used in the development of new, minimally invasive tests enabling the correct diagnosis to be made. The significant differences in the proteome of the sick and

healthy patients demonstrated in this study indicate the possibility of using these methods in clinical practice. Proteomic analyzes are a promising tool in the search for specific biomarkers useful both in the diagnosis and monitoring of the clinical course of UC and CD.

9. WYKAZ TABEL I RYCIN

9.1. Wykaz tabel

Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska aktywności WZJG.

Tabela 2. Klasyfikacja montrealaska ChLC.

Tabela 3. Obliczanie wskaźnika aktywności ChLC (CDAI).

Tabela 4. Klasyfikacja montrealaska zasięgu zmian WZJG.

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów włączonych do badania.

Tabela 6. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **algorytmu genetycznego (GA)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z rozpoznaniem **WZJG** z **grupą kontrolną**.

Tabela 7. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **nadzorowanej sieci neuronowej (SNN)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 8. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla **szybkiego klasyfikatora (QC)** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 9. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 10. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **WZJG** z **grupą kontrolną**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Tabela 11. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 12. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 13. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **WZJG** oraz **grupy kontrolnej**.

Tabela 14. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 15. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 16. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 17. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 18. Piki otrzymane dla algorytmów GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **ChLC** z **grupą kontrolną**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Tabela 19. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu GA do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 20. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 21. Istotność statystyczna piku wykazanego za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 22. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 23. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 24. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 25. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 26. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **ChLC** z **WZJG**. Każda wartość przedstawia stosunek masy do ładunku elektrycznego danego peptydu [m/z], wartości te wyrażone są w Daltonach [Da].

Tabela 27. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 28. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 29. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **ChLC** i **WZJG**.

Tabela 30. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i **grupy kontrolnej**.

Tabela 31. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i **grupy kontrolnej**.

Tabela 32. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i **grupy kontrolnej**.

Tabela 33. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i **grupy kontrolnej**.

Tabela 34. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące **NChZJ** z **grupą kontrolną**.

Tabela 35. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 36. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 37. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** i pacjentów z **grupy kontrolnej**.

Tabela 38. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla algorytmu **GA** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 39. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **SNN** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 40. Walidacja krzyżowa i zdolność rozpoznawania dla modelu **QC** zastosowanego do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 41. Porównanie trzech różnych algorytmów zastosowanych do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z **NChZJ** w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 42. Piki otrzymane dla algorytmu GA, SNN i QC wstępnie zakwalifikowane jako różnicujące pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** z pacjentami w okresie **remisji**.

Tabela 43. Istotność statystyczna pików wykazanych za pomocą algorytmu **GA** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 44. Istotność statystyczna piku wykazanego za pomocą algorytmu **SNN** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

Tabela 45. Istotność statystyczna piku wykazanego za pomocą algorytmu **QC** do różnicowania profilu peptydowego pacjentów z NChZJ w okresie **zaostrzenia** oraz w okresie **remisji** choroby.

9.2. Wykaz rycin

Ryc.1. Zróżnicowanie pacjentów pod względem płci.

Ryc.2. Zróżnicowanie pacjentów pod względem aktywności choroby.

Ryc.3. Schemat działania HPLC [na podstawie: (131, 132)].

Ryc.4. Procesy zachodzące pod wpływem impulsu laserowego - technika MALDI [na podstawie (133)].

Ryc.5. Etapy analizy próbek przy pomocy MALDI- TOF MS [na podstawie (134)].

Ryc.6. Zestaw do badań proteomicznych składający się ze spektrometru mas UltrafleXtreme (Bruker), chromatografu cieczowego Easy-nLC II (Bruker) oraz kolektora frakcji Proteineer fc II (Bruker).

Ryc.7. Średnie widma dla grup: **WZJG**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony.

Ryc.8. Średnie widma dla grup: **ChLC**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony.

Ryc.9. Średnie widma dla grup: **ChLC**- kolor czerwony, **WZJG**- kolor zielony.

Ryc.10. Średnie widma dla grup: **NChZJ**- kolor czerwony, **grupa kontrolna**- kolor zielony.

Ryc.11. Średnie widma dla grup: pacjenci z NChZJ w okresie **zaostżenia**- kolor czerwony, pacjenci z NChZJ w okresie **remisji**- kolor zielony.

10. PIŚMIENNICTWO:

1. Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Prz Gastroenterol.* 2007;2(5):215-29.
2. Xia B, Crusius J, Meuwissen S, Pena A. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World journal of gastroenterology.* 1998;4(5):446-58.
3. Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, Neurath MF, Neumann H. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World journal of gastroenterology.* 2015;21(1):21-46.
4. Talbot IC. Indeterminate colitis: a pathologist's view. *Dig Liver Dis.* 2005;37(9):713-5.
5. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *Journal of Crohn's & colitis.* 2017;11(6):649-70.
6. Dąbrowski A. *Gastroenterologia część II. Wielka Interna. Medical Tribune Polska.* 2011.
7. Szczeklik A. *Interna Szczeklika 2018: Medycyna Praktyczna;* 2018.
8. ECCO obo, Gionchetti P, Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's & colitis.* 2016;11(1):3-25.
9. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1504-17.
10. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's & colitis.* 2013;7(4):322-37.
11. Shivashankar R, Tremaine WJ, Harmsen WS, Loftus EV, Jr. Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota From 1970 Through 2010. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(6):857-63.
12. Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31(1):1-20.
13. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1785-94.
14. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflammatory bowel diseases.* 2007;13(3):254-61.
15. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.

16. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):423-39.
17. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014;63(4):588-97.
18. Burisch J. Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population-based inception cohort. *Dan Med J*. 2014;61(1):B4778.
19. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690-7.
20. Arias-Loste MT, Castro B, Rivero M, Crespo J. Epidemiology of intrafamilial inflammatory bowel disease throughout Europe. *Ann Gastroenterol*. 2012;25(3):188-92.
21. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, et al. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(6):601-6.
22. Jakubowski A, Zagorowicz E, Kraszewska E, Bartnik W. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in Poland. *Pol Arch Med Wewn*. 2014;124(4):180-90.
23. Rydzewska G, Małecka-Panas E. Choroba Leśniowskiego-Crohna: 100 lat diagnostyki i terapii: Termedia Wydawnictwa Medyczne; 2008.
24. Karolewska-Bochenek K, Lazowska-Przeorek I, Albrecht P, Grzybowska K, Ryzko J, Szamotulska K, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland. A prospective, population-based, 2-year study, 2002-2004. *Digestion*. 2009;79(2):121-9.
25. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(17):2630-3.
26. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(7):1559-68.
27. Longo D, Fauci AS, Fauci A, Langford CA. *Harrison's Gastroenterology and Hepatology, 2e*: McGraw-Hill Publishing; 2013.
28. Bhullar M, Macrae F, Brown G, Smith M, Sharpe K. Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(17):5008-16.
29. Abu Freha N, Badarna W, Abu Tailakh M, Abu Kaf H, Fich A, Schwartz D, et al. NOD2/CARD15 Mutations among Bedouin Arabs with Inflammatory Bowel Disease: Frequency and Phenotype Correlation. *Isr Med Assoc J*. 2018;20(11):695-9.

30. Dobrowolska-Zachwieja A, Kaczmarek M, Hoppe-Gołębiewska J, Kalak R, Słomski R, Linke KJNL. Wpływ wariantu mutacji NOD2/CARD15 na występowanie objawów spoza przewodu pokarmowego u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w populacji polskiej. *Now Lek*. 2004;73(5):337-48.
31. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43(3):246-52.
32. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(12):1118-25.
33. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(5):329-42.
34. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(2):409-18.
35. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):521-33.
36. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1490-7.
37. Masuda H, Iwai S, Tanaka T, Hayakawa S. Expression of IL-8, TNF-alpha and IFN-gamma mRNA in ulcerative colitis, particularly in patients with inactive phase. *J Clin Lab Immunol*. 1995;46(3):111-23.
38. Martini GA, Brandes JW. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr*. 1976;54(8):367-71.
39. Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. Increased sugar consumption in Crohn's disease. *Digestion*. 1980;20(5):323-6.
40. Bianchi Porro G, Panza E. Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985;291(6500):971-2.
41. Hansen TS, Jess T, Vind I, Elkjaer M, Nielsen MF, Gomborg M, et al. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a case-control study based on a Danish inception cohort. *Journal of Crohn's & colitis*. 2011;5(6):577-84.
42. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(3):243-9.
43. Asakura H, Suzuki K, Kitahora T, Morizane T. Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(12):1794-801.

44. Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, et al. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut*. 2004;53(10):1479-84.
45. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):563-73.
46. Maconi G, Ardizzone S, Cucino C, Bezzio C, Russo AG, Bianchi Porro G. Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: a case-control study. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(34):4297-304.
47. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Korzenik JR, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2013;145(5):970-7.
48. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(9):2016-25.
49. Teixeira LG, Leonel AJ, Aguilar EC, Batista NV, Alves AC, Coimbra CC, et al. The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation. *Lipids Health Dis*. 2011;10:204.
50. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr*. 1996;63(5):741-5.
51. de Silva PS, Olsen A, Christensen J, Schmidt EB, Overvaad K, Tjønneland A, et al. An association between dietary arachidonic acid, measured in adipose tissue, and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1912-7.
52. John S, Luben R, Shrestha SS, Welch A, Khaw KT, Hart AR. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the aetiology of ulcerative colitis: a UK prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(5):602-6.
53. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2014;63(5):776-84.
54. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(11):1462-71.
55. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *Journal of Crohn's & colitis*. 2014;8(8):717-25.
56. Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(5):573-9.
57. de Saussure P, Clerson P, Prost PL, Truong Tan N, Bouhnik Y, Gil R. Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007;31(5):493-7.

58. Motley RJ, Rhodes J, Ford GA, Wilkinson SP, Chesner IM, Asquith P, et al. Time relationships between cessation of smoking and onset of ulcerative colitis. *Digestion*. 1987;37(2):125-7.
59. Biedermann L, Zeitz J, Mwinyi J, Sutter-Minder E, Rehman A, Ott SJ, et al. Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PloS one*. 2013;8(3):e59260.
60. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. 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):1145-50.
61. Mylonaki M, Langmead L, Pantes A, Johnson F, Rampton DS. Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(8):775-8.
62. Uzoigwe JC, Khaita ML, Gibbs PS. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect*. 2007;135(7):1057-68.
63. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;108(5):1396-404.
64. Wurzelmann JI, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 1994;39(3):555-60.
65. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2925-31.
66. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflammatory bowel diseases*. 2002;8(4):277-86.
67. Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. Appendectomy, tonsillectomy, and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *J Epidemiol Community Health*. 2002;56(7):551-4.
68. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001;344(11):808-14.
69. Beaugerie L, Sokol H. Appendicitis, not appendectomy, is protective against ulcerative colitis, both in the general population and first-degree relatives of patients with IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(2):356-7.
70. Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis AP, Gleim G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(8):1949-54.
71. Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40(5):619-22.

72. Gleeson MH, Davis AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and newly diagnosed colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(6):817-25.
73. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2012;156(5):350-9.
74. Meyer AM, Ramzan NN, Heigh RI, Leighton JA. Relapse of inflammatory bowel disease associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Digestive diseases and sciences.* 2006;51(1):168-72.
75. Lesko SM, Kaufman DW, Rosenberg L, Helmrich SP, Miller DR, Stolley PD, et al. Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users. *Gastroenterology.* 1985;89(5):1046-9.
76. Sandler RS, Wurzelmann JI, Lyles CM. Oral contraceptive use and the risk of inflammatory bowel disease. *Epidemiology.* 1992;3(4):374-8.
77. Ortizo R, Lee SY, Nguyen ET, Jamal MM, Bechtold MM, Nguyen DL. Exposure to oral contraceptives increases the risk for development of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of case-controlled and cohort studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29(9):1064-70.
78. Rhodes JM, Cockel R, Allan RN, Hawker PC, Dawson J, Elias E. Colonic Crohn's disease and use of oral contraception. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984;288(6417):595-6.
79. Hviid A, Svanstrom H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut.* 2011;60(1):49-54.
80. Ortqvist AK, Lundholm C, Halfvarson J, Ludvigsson JF, Almqvist C. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gut.* 2019;68(2):218-25.
81. Virta L, Auvinen A, Helenius H, Huovinen P, Kolho KL. Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric Crohn's disease--a nationwide, register-based finnish case-control study. *Am J Epidemiol.* 2012;175(8):775-84.
82. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(11):1728-38.
83. Sgambato D, Miranda A, Ranaldo R, Federico A, Romano M. The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Curr Pharm Des.* 2017;23(27):3997-4002.
84. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Pan A, Higuchi LM, de Silva P, Richter JM, et al. Association between depressive symptoms and incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis: results from the Nurses' Health Study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(1):57-62.
85. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Sleep duration affects risk for ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(11):1879-86.

86. Maunder RG. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(6):600-8.
87. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;144(1):36-49.
88. Ananthakrishnan AN, Gainer VS, Perez RG, Cai T, Cheng SC, Savova G, et al. Psychiatric comorbidity is associated with increased risk of surgery in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(4):445-54.
89. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53.
90. Wejman J, Bartnik W. Atlas kliniczno-patologiczny nieswoistych chorób zapalnych jelit: Termedia Wydawnictwa Medyczne; 2017.
91. Chambers TJ, Morson BC. The granuloma in Crohn's disease. *Gut*. 1979;20(4):269-74.
92. Geboes KJlbd. What histologic features best differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis? *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(suppl_2):S168-S9.
93. Hashimoto S, Shimizu K, Shibata H, Kanayama S, Tanabe R, Onoda H, et al. Utility of computed tomographic enteroclysis/enterography for the assessment of mucosal healing in Crohn's disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:984916-.
94. Kim SH. Computed tomography enterography and magnetic resonance enterography in the diagnosis of Crohn's disease. *Intest Res*. 2015;13(1):27-38.
95. Ohtsuka K, Takenaka K, Kitazume Y, Fujii T, Matsuoka K, Kimura M, et al. Magnetic resonance enterography for the evaluation of the deep small intestine in Crohn's disease. *Intest Res*. 2016;14(2):120-6.
96. Panes J, Bouhnik Y, Reinisch W, Stoker J, Taylor SA, Baumgart DC, et al. Imaging techniques for assessment of inflammatory bowel disease: joint ECCO and ESGAR evidence-based consensus guidelines. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(7):556-85.
97. Kucharzik T, Wittig BM, Helwig U, Börner N, Rössler A, Rath S, et al. Use of intestinal ultrasound to monitor Crohn's disease activity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(4):535-42. e2.
98. Calabrese E, Zorzi F, Pallone F, Iijoi. Ultrasound of the small bowel in Crohn's disease. *Int J Inflam*. 2012;2012.
99. Maconi G, Porro GB. *Ultrasound of the gastrointestinal tract*: Springer; 2014.
100. Parente F, Greco S, Molteni M, Cucino C, Maconi G, Sampietro GM, et al. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18(10):1009-16.
101. Plevy S, Silverberg MS, Lockton S, Stockfisch T, Croner L, Stachelski J, et al. Combined Serological, Genetic, and Inflammatory Markers Differentiate Non-IBD, Crohn's Disease, and Ulcerative Colitis Patients. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1139-48.

102. Reumaux D, Sendid B, Poulain D, Duthilleul P, Dewit O, Colombel J-FJBP, et al. Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003;17(1):19-35.
103. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2012;18(12):2218-24.
104. Kostas A, Siakavellas SI, Kosmidis C, Takou A, Nikou J, Maropoulos G, et al. Fecal calprotectin measurement is a marker of short-term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(41):7387-96.
105. Gisbert JP, Bermejo F, Pérez-Calle J-L, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, et al. Fecal Calprotectin and Lactoferrin for the Prediction of Inflammatory Bowel Disease Relapse. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(8):1190-8.
106. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä MJ. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(1):40-6.
107. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, KOLHO KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(10):1221-9.
108. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017;11(7):769-84.
109. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 2: surgical management and special situations. 2017;11(2):135-49.
110. Hasin Y, Seldin M, Lusk A. Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*. 2017;18(1):83-.
111. Walhout M, Vidal M, Dekker J. *Handbook of systems biology: concepts and insights*: Academic Press; 2012.
112. Boja ES, Kinsinger CR, Rodriguez H, Srinivas P, on behalf of Omics Integration Workshop P. Integration of omics sciences to advance biology and medicine. *Clinical Proteomics*. 2014;11(1):45.
113. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998;19(11):1853-61.
114. Tyers M, Mann MJN. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):193.
115. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995;16(7):1090-4.
116. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.

117. Hanash SJN. Disease proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):226.
118. Vaipoulou A, Gazouli M, Papadopoulou A, Anagnostopoulos AK, Karamanolis G, Theodoropoulos GE, et al. Serum protein profiling of adults and children with Crohn disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2015;60(1):42-7.
119. Tambor V, Fucikova A, Lenco J, Kacerovsky M, Rehacek V, Stulik J, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res*. 2010;59(4):471-97.
120. Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. A proteomic primer for the clinician. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(1):9-17.
121. Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev*. 2006;27(2):99-116.
122. Han X, Aslanian A, Yates III JR, Coicb. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(5):483-90.
123. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
124. Rogler G, Biedermann L. Clinical Utility of Biomarkers in IBD. *Current gastroenterology reports*. 2015;17(7):26.
125. Yau Y, Leong RW, Zeng M, Wasinger VC, Joga, hepatology. Proteomics and metabolomics in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(7):1076-86.
126. Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*. 2010;56(2):177-85.
127. Chan PP, Wasinger VC, Leong RW. Current application of proteomics in biomarker discovery for inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2016;7(1):27-37.
128. Wasinger VC, Yau Y, Duo X, Zeng M, Campbell B, Shin S, et al. Low Mass Blood Peptides Discriminative of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Severity: A Quantitative Proteomic Perspective. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(1):256-65.
129. Derici U, Tuncer C, Ebinc FA, Mutluay R, Yakaryilmaz F, Kulaksizoglu S, et al. Does the urinary excretion of alpha1-microglobulin and albumin predict clinical disease activity in ulcerative colitis? *Adv Ther*. 2008;25(12):1342-52.
130. Shkoda A, Werner T, Daniel H, Gunckel M, Rogler G, Haller DJ, Jopr. Differential protein expression profile in the intestinal epithelium from patients with inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007;6(3):1114-25.
131. Mitulović G, Mechtler K, BiFG. HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. 2006;5(4):249-60.
132. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development*: John Wiley & Sons; 2012.

133. Gross JH. Mass spectrometry: a textbook: Springer Science & Business Media; 2006.
134. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(3):547-603.
135. Szewczyk R. Spektrometria mas–standard analityczny. *J LAB*. 2013;18(3):15-6.
136. Swiatly A, Horala A, Hajduk J, Matysiak J, Nowak-Markwitz E, Kokot ZJ. MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC cancer*. 2017;17(1):472.
137. ClinProTools 3.0. User Manual. Basics on Data Preparation, Model Generation and Spectra Classification. Bruker Daltonik GmbH. 2011:62-75.
138. Poggioli G, Renzi N. Presentation and Natural Course of Ulcerative Colitis. *Ulcerative Colitis: Springer*; 2019. p. 17-28.
139. Aniwaniwan S, Harmsen WS, Tremaine WJ, Loftus EV, Jr. Incidence of inflammatory bowel disease by race and ethnicity in a population-based inception cohort from 1970 through 2010. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819827692.
140. Gecse KB, Vermeire SJTLG, Hepatology. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications. 2018;3(9):644-53.
141. Schoepfer AM, Trummel M, Seeholzer P, Seibold-Schmid B, Seibold FJ. Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. 2007;14(1):32-9.
142. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1275-85.e2.
143. Fiocchi C. Integrating omics: the future of IBD? *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2014;32 Suppl 1:96-102.
144. Bessissow T, Van Keerberghen CA, Van Oudenhove L, Ferrante M, Vermeire S, Rutgeerts P, et al. Anxiety is associated with impaired tolerance of colonoscopy preparation in inflammatory bowel disease and controls. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(11):e580-7.
145. Lachmann P. Genetics of the complement system. *Journal of medical genetics*. 1975;12(4):372-7.
146. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunological reviews*. 2001;180:35-48.
147. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology & Immunology*. 2012;2(2):103-11.
148. Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(14):8610-7.

149. Blais C, Jr., Marceau F, Rouleau JL, Adam A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*. 2000;21(12):1903-40.
150. Wang J, Wang X, Lin S, Chen C, Wang C, Ma Q, et al. Identification of kininogen-1 as a serum biomarker for the early detection of advanced colorectal adenoma and colorectal cancer. *PLoS one*. 2013;8(7):e70519.
151. Yu J, Huang Y, Lin C, Li X, Fang X, Zhong C, et al. Identification of Kininogen 1 as a Serum Protein Marker of Colorectal Adenoma in Patients with a Family History of Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*. 2018;9(3):540-7.
152. Schniers A, Anderssen E, Fenton CG, Goll R, Pasing Y, Paulssen RH, et al. The Proteome of Ulcerative Colitis in Colon Biopsies from Adults - Optimized Sample Preparation and Comparison with Healthy Controls. *Proteomics Clinical applications*. 2017;11(11-12).
153. Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, Bonderup OK, Glerup H, Bøgsted M, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(9):2052-67.
154. Nanni P, Levander F, Roda G, Caponi A, James P, Roda A. A label-free nano-liquid chromatography-mass spectrometry approach for quantitative serum peptidomics in Crohn's disease patients. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2009;877(27):3127-36.
155. Vitorino de Almeida V, Silva-Herdade A, Calado A, Rosario HS, Saldanha C. Fibrinogen modulates leukocyte recruitment in vivo during the acute inflammatory response. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2015;59(2):97-106.
156. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry*. 2005;70:247-99.
157. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clinical medicine insights Gastroenterology*. 2015;8:29-44.
158. Di Narzo AF, Brodmerkel C, Telesco SE, Argmann C, Peters LA, Li K, et al. High-Throughput Identification of the Plasma Proteomic Signature of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2019;13(4):462-71.
159. Subramanian V, Subramanian D, RC P. Serum protein signatures determined by mass spectrometry (SELDI-ToF) accurately distinguishes Crohn's disease (CD) from ulcerative colitis (UC). *J Gastroenterology*. 2008;134(4):A-196.
160. Hatsugai M, Kurokawa MS, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, et al. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of gastroenterology*. 2010;45(5):488-500.
161. M'Koma AE, Seeley EH, Washington MK, Schwartz DA, Muldoon RL, Herline AJ, et al. Proteomic profiling of mucosal and submucosal colonic tissues yields protein signatures that differentiate the inflammatory colitides. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(4):875-83.

162. Meuwis MA, Fillet M, Lutteri L, Maree R, Geurts P, de Seny D, et al. Proteomics for prediction and characterization of response to infliximab in Crohn's disease: a pilot study. *Clinical biochemistry*. 2008;41(12):960-7.
163. Gazouli M, Anagnostopoulos AK, Papadopoulou A, Vaiopoulou A, Papamichael K, Mantzaris G, et al. Serum protein profile of Crohn's disease treated with infliximab. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(10):e461-70.