

lek. Paulina Gulbicka

Ocena profilu białkowego u pacjentów z chorobą trzewną oraz zespołem zaburzeń
wchłaniania

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Marian Grzymisławski

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Wydział Medyczny
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2020

Serdeczne podziękowania składam dla :

Pana Prof. Mariana Grzyniśławskiego za poświęcony czas oraz cenne wskazówki, gdyż bez jego nadzoru praca ta by nie powstała

Pana Profesora Zenona Kokota, Kierownika Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej za współpracę w wykonaniu badań oraz nadzór merytoryczny

Pana Docenta Jana Matysiaka, obecnego Kierownika Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej za umożliwienie wykonania badań oraz nadzór merytoryczny

Spis treści

Wykaz skrótów.....	3
Spis tabel.....	5
1. Wstęp.....	7
1.1 Celiakia – etiopatogeneza i problemy diagnostyczne.....	8
1.2 SIBO - etiopatogeneza i problemy diagnostyczne.....	16
1.3 Badania proteomiczne.....	21
1.4 Implikacje kliniczne wynikające z braku rozpoznania.....	22
2. Cele pracy.....	29
3. Materiał i metody.....	30
3.1. Charakterystyka badanej grupy.....	30
3.2. Metodyka badań.....	32
3.3. Analiza statystyczna.....	33
4. Wyniki.....	35
4.1. Charakterystyka kliniczna.....	35
4.2. Porównanie surowic pacjentów celiakia/grupa kontrolna.....	38
4.2.1. Genetic Algorithm.....	39
4.2.2. Supervised Neural Network.....	41
4.2.3. Quick Classifier.....	43
4.3. Porównanie surowic pacjentów SIBO/grupa kontrolna.....	44
4.3.1. Genetic Algorithm.....	44
4.3.2. Supervised Neural Network.....	46
4.3.3. Quick Classifier.....	48
4.4. Porównanie surowic pacjentów celiakia/SIBO.....	50
4.2.1. Genetic Algorithm.....	50
4.2.2. Supervised Neural Network.....	52
4.2.3. Quick Classifier.....	54
5.1 Dyskusja.....	57
5.2. Krytyka metody.....	67
6. Wnioski.....	69
7. Streszczenie.....	70
8. Summary.....	72
9. Literatura.....	74

Wykaz skrótów:

ACN – acetonitrile -acetonitryl

AGA – anti gliadin antibodies – przeciwciała antygliadynowe

APC – antigen presenting cell – komórka prezentująca antygen

ATP - adenosine triphosphate – trifosforan adenozyne

BMI – body mass index – wskaźnik masy ciała

CFU – colony forming unit – jednostka formująca kolonię

CVID - common variable immunodeficiency – ciężki złożony niedobór odporności

CXCR – chemokine receptor – receptor dla chemokin

DGP – deamidated gliadin peptide – deamidowane peptydy gliadynowe

EATL - enteropathy – associated T – cell lymphoma – chłoniak z komórek T na tle enteropatii

EC – enterocytes - enterocyty

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay – test immunoenzymatyczny

EMA – anti – endomysial antibodies – przeciwciała antyendomyzjalne

ESI - electrospray ionization – jonizacja elektrospreju

GA – genetic algorithm – algorytm genetyczny

GAD - glutamic acid decarboxylase

GVHD - graft versus host disease – choroba przeszczep przeciwko biorcy

HCCA - 4-Cyano-4-hydroxycinnamic acid – kwas cyjano – 4 - hydroksycynamonowy

HLA – human leucocytes antigen – antygen ludzkich leukocytów

HPLC - high – performance liquid chromatography – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IBS – irritable bowel syndrome – zespół jelita drażliwego

IEL – intraepithelial lymphocytes – leukocyty intraepitelialne

IL – interleukine - interleukina

INR -International Normalized Ratio – międzynarodowy normalizowany wskaźnik

JAK3 - Janus Kinase 3 – kinaza Janus 3

LGR1 - Leucine-richrepeat-containing G-protein – białko G bogate w leucynę

LPS – Lipopolysaccharide - lipopolisacharyd

MALDI -TOF - matrix assisted laser desorption ionization time of flight – matrycowa jonizacja wspomagana desorpcją laserową, czas przelotu

MHC – major histocompatibility complex – główny kompleks zgodności tkankowej

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne
NGCS – non-celiac gluten sensitivity – nieceliakalna nadwrażliwość na gluten

NAFLD - non-alcoholic fatty liver disease – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

PEPCK - phosphoenolpyruvate carboxykinase – karboksykinaza fosfoenolopirogronianu

PPI -proton pump inhibitor – inhibitor pompy protonowej

PTH – parathormone – parathormone

QC – quick classifier – szybki klasyfikator

RCD - refractory celiac disease – celiakia dietooporna

SDPR – serum deprivation response protein – białko surowicy hamujące odpowiedź

SHBG – sex hormone binding protein – białko wiążące hormony płciowe

SIBO – small intestinal bacterial overgrowth – przerost bakteryjny jelita cienkiego

SIFO - small intestinal fungal overgrowth – przerost grzybiczy jelita cienkiego

SNN – supervised neural network – nadzorowana sieć neuronowa

SNVA – seronegative villous atrophy – zanik kosmków seronegatywny

STAT5 - signal transducer and activator of transcription 5 – białko transdukcji sygnału I aktywator transkrypcji 5

TGF - transforming growth factor – czynnik wzrostu transformujący

TLR4 – toll like receptor – receptor toll podobny

TNF – tumor necrosis factor – czynnik martwicy guza

TTG – tissue transglutaminase – tkankowa transglutaminaza

Spis tabel i wykresów

Tabele:

1. Czułość i specyficzność oraz zastosowanie badań serologicznych w diagnostyce celiakii.....	12
2. Skala Marsha.....	13
3. Uproszczenie skali Marsha wg Corazza.....	14
4. Diagnostyka różnicowa celiakii, NCGS oraz alergii na pszenicę.....	15
5. Rekomendacje British Society of Gastroenterology – badania kontrolne osoby dorosłej z celiakią.....	16
6. Mechanizmy odpowiedzialne za deficyty składników odżywczych w przebiegu SIBO.....	19
7. Parametry antropometryczne badanej grupy.....	31
8. Wartości walidacji krzyżowej, walidacji zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych algorytmów.....	38
9. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value).....	39
10. Piki różnicujące – identyfikacja peptydów.....	40
11. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	41
12. Piki różnicujące – identyfikacja peptydów.....	42
13. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	43
14. Piki różnicujące – identyfikacja peptydów.....	43
15. Porównanie parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami celiakia/grupa kontrolna.....	43
16. Wartości walidacji krzyżowej, walidacji zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych algorytmów.....	44
17. Istotność statystyczna pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	44
18. Piki różnicujące wraz identyfikacją.....	45
19. Wartości p- value w poszczególnych testach statystycznych – piki zakwalifikowane do klasyfikacji.....	45
20. Piki różnicujące oraz identyfikacja.....	47
21. Istotność statystyczna pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	48
22. Piki różnicujące oraz identyfikacja.....	49
23. Porównanie parametrów laboratoryjnych – grupy SIBO/grupa kontrolna.....	49

24. Wartości walidacji krzyżowej, zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych modeli.....	50
25. Istotność statystyczna - p - value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	50
26. Piki różnicujące oraz identyfikacja.....	51
27. Istotność statystyczna – p- value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	52
28. Piki różnicujące i identyfikacja.....	53
29. Istotność statystyczna – p- value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.....	54
30. Piki różnicujące oraz identyfikacja.....	54
31. Porównanie parametrów laboratoryjnych – grupy celiakia/SIBO.....	54

Spis wykresów

1. Struktura płci grupy badanej.....	31
2. Objawy manifestowane przez pacjentów oraz schorzenia współistniejące (celiakia).....	36
3. Objawy manifestowane przez pacjentów oraz schorzenia współistniejące (SIBO).....	37
4. Objawy manifestowane przez pacjentów oraz schorzenia współistniejące (kontrola).....	38
Ryc. 1. Graficzne przedstawienie wyników.....	56

1. Wstęp

Podstawową funkcją układu pokarmowego jest trawienie i absorpcja składników odżywczych dostarczanych wraz z pożywieniem. Ponadto skoordynowana praca wątroby i trzustki jest niezbędna do osiągnięcia prawidłowego odżywienia. Trawienie pokarmów jest złożonym procesem, zależne jest od sekrecji śliny, hormonów jelitowych, enzymów czy motoryki przewodu pokarmowego. Jakakolwiek patologia w obrębie żołądka czy jelit powstała na skutek zabiegów chirurgicznych, chorób autoimmunologicznych czy hiperkolonizacji bakteryjnej może być przyczyną zespołu zaburzeń wchłaniania. Bardzo częstym objawem, który utrudnia normalne funkcjonowanie chorego jest biegunka oraz tłuszczowe stolce, jednak nie zawsze te objawy muszą być manifestowane przez pacjentów. [1]

Zespół zaburzeń wchłaniania obejmuje wiele jednostek klinicznych, które prowadzą do przewlekłych biegunek, wzdęć oraz niedożywienia, a zaburzenia te mogą być wrodzone lub nabyte.[2] Celiakia jest szczególnym typem zespołu zaburzeń wchłaniania, patogeneza jest wieloczynnikowa i nie do końca jeszcze poznana. [3] Badania pokazują, że w ciągu 20 lat wzrosła częstość rozpoznawania choroby trzewnej.[4]

Z uwagi na różnorodne manifestacje kliniczne od początku objawów do postawienia rozpoznania mija niekiedy wiele lat, ponadto chorobę trzewną i inne zespoły zaburzeń wchłaniania należy różnicować z innymi jednostkami klinicznymi np. nieswoistymi zapaleniami jelit. [5]

Inną, częstą przyczyną zespołu zaburzeń wchłaniania jest SIBO – przerost bakteryjny jelita cienkiego (small intestine bacterial overgrowth), który również prowadzi do ogólnoustrojowych następstw takich jak osteoporoza i niedokrwistość makrocytarna. [6]

W rozprawie doktorskiej ze względu na mnogość jednostek chorobowych powodujących zespół zaburzeń wchłaniania oraz różne manifestacje kliniczne dokonam analizy choroby trzewnej oraz SIBO ze względu na wzrost zachorowalności w ostatnich latach. [4,6] Celem pracy była ocena profilu białkowego w surowicy krwi u pacjentów z chorobą trzewną oraz przerostem bakteryjnym w poszukiwaniu nowych, małoinwazyjnych metod diagnostycznych. Na początku omówiłam definicję, etiopatogenezę oraz wątpliwości diagnostyczne w rozpoznawaniu celiakii oraz SIBO, w kolejnych rozdziałach przedstawiłam materiał oraz metody oraz oceniłam zależności pomiędzy wynikami badań proteomicznych, stanu klinicznego pacjentów oraz wynikami badań laboratoryjnych, a na koniec wyciągnęłam konstruktywne wnioski.

1.1 Celiakia – etiopatogeneza oraz problemy diagnostyczne.

Celiakia definiowana jest jako choroba o podłożu immunologicznym; objawy wywoływane są przez spożycie glutenu u osób predysponowanych. [7] Pierwszy raz jako choroba została opisana w 1887 r przez Samuela Gee, natomiast hipotezę sugerującą spożycie zbóż jako przyczynę schorzenia przedstawił w 1941 William Dickie. [8]

Na rozwój choroby wpływa wiele czynników m.in. środowiskowe, immunologiczne oraz genetyczne. [9] Zwiększone ryzyko zachorowania na chorobę trzewną występuje u osób z rozpoznaną cukrzycą typu 1, zespołem Turnera, zespołem Williamsa, autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy i/lub wątroby, niedoborem przeciwciał w klasie IgA oraz u krewnych I stopnia chorych na celiakię. Pod wpływem spożywania glutenu dochodzi do wytwarzania swoistych przeciwciał oraz reakcji zapalnej i niszczenia kosmków w obrębie jelita cienkiego. [10]

Choroba trzewna była od zawsze uważana za chorobę wieku rozwojowego, obecnie obserwuje się wzrost liczby zachorowań u osób dorosłych i starszych. W 1960 roku około 4% nowych przypadków celiakii dotyczyło osób po 60 roku życia, w późniejszych latach według badań odsetek ten zwiększył się do 34%. Częściej chorują kobiety w stosunku 2:1, po 65 r. ż następuje wyrównanie proporcji. [11] W przypadku członków rodziny osoby chorej ryzyko wystąpienia objawów choroby wynosi około 10%, natomiast u bliźniąt jednojajowych ryzyko to wynosi około 75%. Badania epidemiologiczne pokazują, że częstość występowania choroby trzewnej w Europie oraz na innych kontynentach wynosi 1:200 lub nawet 1:100 co odpowiada 0,18% - 1,2% populacji ogólnej. [12] W populacji Ameryki Łacińskiej odsetek zachorowań wynosi między 0,46% a 0,64% liczby ludności, [13] natomiast w krajach azjatyckich takich jak Indonezja, Japonia czy Korea z uwagi na niskie spożycie zbóż choroba trzewna występuje rzadko. [4]

Spożywanie glutenu oraz posiadanie odpowiednich antygenów HLA uważane jest za główne czynniki wywołujące chorobę. Sugerowane jest silne powiązanie z antygenami HLA -DQ2 (allele DQA1*05/DQB1*02) oraz HLA – DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302). Pacjenci manifestujący objawy kliniczne celiakii w 90-95% posiadają haplotypy HLA – DQ2 oraz w 5-10% haplotypy HLA – DQ8. [14] Z antygenów HLA – DQ2 można wyodrębnić 2 podtypy : HLA – DQ2.5 oraz HLA – DQ2.2. Bardzo silne powiązanie między posiadaniem haplotypu HLA – DQ2.5 a chorobą trzewną tłumaczy się powinowactwem do białek wiążących gluten; natomiast posiadanie haplotypu HLA - DQ2.2 przyczynia się mniej do ryzyka zachorowania. Ponadto ryzyko jest porównywalnie większe u homozygot HLA – DQ2.5 lub genotypów HLA – DQ2.2/DQ2.5 w stosunku do homozygot HLA -DQ2.2 lub heterozygot HLA – DQ2.5 lub DQ2.2. [15]

Główną rolę w patogenezie choroby odgrywa spożywanie glutenu. Jest to nierozpuszczalna w wodzie frakcja białek występująca w ziarnach zbóż (gliadyna w pszenicy, sekalina w życie, hordeina w jęczmieniu) oraz gatunkach mieszanych. [16-17] Glutamina stanowi około 35% udziału aminokwasów w białkach glutenowych, natomiast prolina 15-20%. [18] Gliadyny i gluteniny są białkami występującymi naturalnie w pszenicy. Ze wszystkich białek pochodzących ze zbóż największy potencjał immunogenny posiadają gliadyny, co więcej różne typy gliadyn (alfa/beta, gamma oraz omega) mogą na wiele sposobów stymulować limfocyty T. Gliadyny kodowane są przez 6 głównych loci: Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1 oraz Gli-A2, Gli – B2 oraz Gli -D2 na krótkich ramionach homologicznych chromosomów 1 i 6. [19] Największą immunogennością cechują się gliadyny alfa; zidentyfikowano 4 epitopy odpowiedzialne za stymulację limfocytów T: dwa większe – związane z nakładaniem się DQ2.5 – $\text{glia}\alpha 1$ i $\alpha 2$ oraz mniejsze związane z DQ2.5 – $\text{glia}\alpha 3$ oraz DQ8 – $\text{glia}\alpha 1$. Badania pokazują, że immunogenność poszczególnych gatunków zbóż różni się między sobą. [20] Współczesne odmiany pszenicy modyfikowane genetycznie cechują się większą immunogennością, zwłaszcza w zakresie epitopów $\text{glia} - \alpha 9$ (PFPQPQLPY) oraz $\text{glia} - \alpha 20$ (FRPQQP – YPQ) w stosunku do odmian uprawianych w przeszłości. [21]

W warunkach fizjologicznych enzymy rąbka szczoteczkowego jelita cienkiego, żołądka czy trzustki katalizują reakcję hydrolizy białek na mniejsze peptydy lub aminokwasy, jednak w przebiegu celiakii toksyczne peptydy bogate w prolinę są trudne do trawienia. Z uwagi na brak możliwości hydrolizy dochodzi do akumulacji fragmentów białkowych zawierających spore ilości proliny oraz glutaminy w świetle jelita cienkiego. Limfocyty T CD4^+ rozpoznają epitopy peptydowe, które prezentowane są przez kompleks MHC II, co prowadzi do wywołania reakcji zapalnej. Dochodzi do zaburzeń w zakresie integralności połączeń międzykomórkowych błony śluzowej jelita cienkiego oraz aktywacji podnabłonkowej tkanki limfoidalnej. Badania sugerują także udział zonuliny we wzroście przepuszczalności błony śluzowej u pacjentów z celiakią. [22] Interakcja limfocytów T pomiędzy deamidowanymi peptydami gliadynowymi powstającymi z trawienia glutenu oraz cząsteczkami HLA DQ2/8 indukującymi aktywację limfocytów w blaszce właściwej błony śluzowej prowadzi do destrukcji tkanek. Jednakże część osób zdrowych również posiada antygeny HLA DQ2/8. [23]

Limfocyty T CD4^+ rozpoznają epitopy białek glutenowych prezentowanych przez kompleksy HLA, w następstwie czego uwalniają duże ilości interferonu gamma oraz cytokin prozapalnych. Ponadto limfocyty T aktywują limfocyty B do produkcji przeciwciał przeciwko transglutaminazie tkankowej czy peptydom gliadynowym specyficznym dla choroby trzewnej. Transglutaminaza tkankowa jest enzymem katalizującym deamidację peptydów glutenowych; takie modyfikacje nadają ujemny ładunek peptydom, które silnie wiążą się z cząsteczkami HLA. Limfocyty T są skierowane przeciwko deamidowanym peptydom a nie peptydom natywnym. Specyficzność enzymu transglutaminaza tkankowa ma kluczowe znaczenie w selekcji epitopów dla limfocytów T. [24] Deamidowane peptydy gliadynowe bardzo silnie

wiążą się z heterodimerami HLA - DQ2/DQ8 znajdującymi się na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC – antygen presenting cel) czyli makrofagach i komórkach dendrytycznych. Prezentacja antygeny prowadzi do aktywacji limfocytów T oraz uwalniania interferonu. Temu zjawisku towarzyszy aktywacja odporności nieswoistej związanej z interleukiną 15 (IL -15). Osoby chorujące na celiakię cechują się wyższym stężeniem IL – 15. Wysokie stężenie IL – 15 prowadzi do nadekspresji receptora NKG2D dla komórek NK (naturalkillers) oraz CD94/NKG2C na powierzchni cytotoksycznych limfocytów śródepitelialnych jelita (IEL; intraepithelial lymphocytes), co z kolei prowadzi do niszczenia enterocytów oraz umożliwia wnikanie peptydów gliadynowych w głąb blaszki właściwej oraz dalszej immunizacji. [25] Rola komórkowej odpowiedzi immunologicznej w patogenezie choroby trzewnej jest tylko częściowo wyjaśniona. W schorzeniach autoimmunologicznych początkowo opisywana jest polaryzacja limfocytów CD4+ Th1, jednakże także zaangażowane zostają limfocyty Th17, co jest charakterystyczne dla ostrej reakcji zapalnej. Odsetek limfocytów Th17 u osób chorujących na celiakię jest niższy i podobny do tego obserwowanego u osób zdrowych. W przypadku współistnienia choroby Hashimoto odsetek ten jest znacząco wyższy. [26]

Wyróżnia się cztery postacie kliniczne choroby trzewnej:

- P1 – klasyczna postać celiakii – pacjenci głównie manifestują biegunki, zmęczenie, zespół zaburzeń wchłaniania oraz ogólnie pojęte niedożywienie,
- P2 – nieklasyczna postać celiakii – pacjenci prezentują niespecyficzne objawy takie jak niepłodność, niewyjaśniona niedokrwistość z niedoboru żelaza, osteoporoza, Dermatitis herpetiformis, niewyjaśnione choroby wątroby czy objawy neurologiczne,
- P3 – postać latentna - pacjenci serologicznie dodatni z prawidłową histologicznie architekturą błony śluzowej dwunastnicy,
- P4 – pacjenci z chorobą wykrytą w trakcie badań przesiewowych grup podwyższonego ryzyka. [27]

Badania przesiewowe w kierunku celiakii wykonuje się u pacjentów manifestujących objawy gastroenterologiczne oraz dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku celiakii; z rozpoznanymi chorobami autoimmunologicznymi, niedoborem przeciwciał w klasie IgA, niewyjaśnioną niedokrwistością z niedoboru żelaza oporną na suplementację doustną czy rozpoznanym dermatitis herpetiformis na podstawie biopsji skóry. Mniejsze ryzyko zachorowania będące również wskazaniem do testów przesiewowych obejmuje pacjentów z rozpoznanym zespołem Downa/Turnera, zaburzeniami płodności, zespołem jelita drażliwego, ataksją, zaburzeniami w obrębie szkliva czy mikroskopowym zapaleniem jelita grubego. [28] Badania pokazują, że 1 na 31 pacjentów z niedokrwistością z niedoboru żelaza prezentuje histologiczne cechy celiakii, stąd potrzeba wykonywania badań przesiewowych u tych pacjentów. [29]

W zależności od wieku w momencie rozpoznania dominują zróżnicowane objawy. Dzieci do lat dwóch najczęściej manifestują niedożywienie, biegunki, wzdęcia, wymioty czy atrofię mięśniową. Starsze dzieci prezentują bóle brzucha, niedobór wzrostu, opóźnienie dojrzewania płciowego czy luźne wypróżnienia. Osoby dorosłe prezentują zespół jelita drażliwego, zaparcia, osteoporozę, niedobór żelaza czy wzrost parametrów wątrobowych (transaminaz). [30] Pacjenci po 65 roku życia w 80 % manifestują niedokrwistość z niedoboru żelaza, otyłość, zaburzenia neurologiczne oraz z układu sercowo naczyniowego, osteopenię. Niższy jest też stopień destrukcji kosmków – w skali Marsha jest to 1-2. Objawy gastroenterologiczne są niespecyficzne; najczęściej są to wzdęcia, zaparcia, dyskomfort w jamie brzusznej, rzadko występuje niedożywienie.[11,31]

Szczególą postacią jest dermatitis herpetiformis – opryszczkowate zapalenie skóry, choroba Duhringa – przewlekła dermatoza pęcherzowa przebiegająca z immunizacją wobec transglutaminaz, najczęściej występuje w 3 dekadzie życia. Głównym antygenem jest transglutaminaza naskórkowa tworząca depozyty w skórze razem z IgA stając się induktorem aktywacji neutrofili wraz z tworzeniem pęcherzyków. Zmiany skórne o charakterze rumienia i pęcherzyków występują na łokciach, kolanach, pośladkach, okolicy krzyżowej i łopatkach. Sama celiakia zaś ma przebieg bezobjawowy.[32]

W badaniach laboratoryjnych występują niedobory witamin A,D,E, żelaza oraz cynku, hipoalbuminemia czy niewyjaśniony wzrost transaminaz. Rzadko występują niedobory witaminy B12. [33-34]

Diagnostyka serologiczna obejmuje badania krwi w kierunku przeciwciał anty tTG w klasie IgA (przeciwko transglutaminazie tkankowej) oraz EMA (przeciwko endomysium). W przypadku stwierdzonego niedoboru przeciwciał w klasie IgA wykonuje się testy na obecność przeciwciał anty tTG w klasie IgG oraz anty DGP w klasie IgG (przeciwko deamidowanym peptydom gliadynowym). Testy do wykrywania anty DGP w klasach IgA oraz IgG są bardziej specyficzne od testów bazujących na natywnej gliadynie (AGA – antigliadin antibodies). [35] Według wielu badań przeciwciała anty tTG w klasie IgA oraz EMA cechują się swoistością i specyficznością powyżej 95% [36] W przypadku uzyskania u dzieci stężeń przeciwciał anty tTG IgA oraz anty DGP IgA 10x powyżej górnej granicy normy można rozważyć odstąpienie od biopsji dwunastnicy. [37]. Badania serologiczne wykorzystywane są także do monitorowania przestrzegania diety bezglutenowej. [34]

Tabela 1. Czulość i specyficzność oraz zastosowanie badań serologicznych w diagnostyce celiakii.

Opracowane na podstawie: [7]

Badanie	czulość (w %)	specyficzność (w %)	Zastosowanie w diagnostyce
IgAtTG	73,9-100	77,8-100	test przesiewowy w diagnostyce celiakii
IgG DGP	80,1-96,9	86,0-96,9	test przesiewowy w diagnostyce celiakii u pacjentów z niedoborem przeciwciał w klasie IgA
IgA EMA	82,6-100	94,7-100	test potwierdzający
IgGtTG	12,6-99,3	86,3-100	niska czulość w porównaniu do testu IgG DGP
IgA DGP	80,7-95,1	86,3-91,3	niska czulości specyficzność w porównaniu do testów IgAtTG i IgA EMA

Najnowsze badania donoszą, że zidentyfikowano immunogeny epitop kompleksu tTG – DGP, który charakteryzuje się 100% specyficznością oraz 99% czulością w diagnostyce i monitorowaniu celiakii, co będzie można z pewnością wykorzystać w przyszłości. [38]

W diagnostyce choroby trzewnej uwzględnia się także typowanie HLA – DQ2/DQ8. Testy te wykonuje się w przypadku niepewnej diagnozy i pomocne są przy wykluczaniu choroby.[39]

Wykonanie biopsji dwunastnicy jest niezbędne dla postawienia rozpoznania. Obraz endoskopowy w czasie trwania ostrej fazy choroby uwidacznia zanik fałdów z możliwym wyżłobieniem ich brzegów czy mozaikową strukturą powierzchni błony śluzowej. Oceny histopatologicznej dokonuje się zwykle w 4 stopniowej skali Marsha i tak stopień 0 odpowiada brakowi zmian w badaniu histopatologicznym, stopień 1 – wzrost liczby leukocytów śródnabłonkowych z prawidłowymi kosmkami w badaniu, stopień 2 obejmuje dodatkowo przerost krypt, stopień 3 : zanik kosmków oraz pogrubienie błony śluzowej. Stopień 3 dzieli się na stopień 3a, 3b oraz 3c, które różnią się między sobą nasileniem destrukcji kosmków. Liczba limfocytów >40 na 100 enterocytów. [40]

Tabela 2. Skala Marsha – opracowane na podstawie [28]

Histopatologia	Liczba IEL/100 EC	Zanik kosmków	Przerost krytp
Marsh 0	<40/100	(-)	(-)
Marsh 1	>40/100	(-)	(-)
Marsh 2	>40/100	(-)	Hiperplastyczny
Marsh 3a	>40/100	Zanik niskiego stopnia	Hiperplastyczny
Marsh 3b	>40/100	Zanik średniego stopnia	Hiperplastyczny
Marsh 3c	>40/100	Zanik całkowity	Hiperplastyczny

IEL – limfocyty wewnątrz – epitelialne, EC –enterocyty

Tabela 3. Uproszczona skala Marsha wg Corazza. Opracowane na podstawie [41]

Klasyfikacja Marsha	Klasyfikacja Corazza
1	Stopień A
2	
3a	Stopień B1
3b	
3c	Stopień B2

Pomimo wzrostu wykrywalności choroby w endoskopii nie wszyscy pacjenci zostają zdiagnozowani, co więcej 5-14% chorych nie miało pobranych wycinków z uwagi brak występowania endoskopowych markerów celiakii takich jak mozaikowość błony śluzowej czy wygładzenie fałdów. Nowe metody endoskopowe takie jak I - scan (technika dostępna w aparatach firmy PENTAX), które można opisać jako metody „wirtualnej chromo – endoskopii” pozwalają na lepsze wykrywanie choroby trzewnej podczas rutynowych badań. [42] Choroba z zajęciem ultrakrótkiego odcinka jelita może występować u osób dorosłych; pobranie dodatkowego wycinka z części D1 (opuszka dwunastnicy) zwiększa czułość wykrywania choroby trzewnej. Pacjenci ci mają najczęściej łagodną fenotypowo postać celiakii lub zostali zdiagnozowani we wczesnej fazie choroby [43]

Celiakia ze względu na różnorodność prezentowanych objawów jest późno diagnozowana, rzadziej rozpoznanie jest stawiane u młodych mężczyzn z uwagi na skąpoobjawowy przebieg. Młode kobiety mają bardziej nasilone objawy, częściej szukają przyczyn różnych zaburzeń m.in. niedokrwistości z niedoboru żelaza; częściej występują biegunki czy choroby autoimmunologiczne. Ponadto mężczyźni rzadziej udają się po pomoc lekarską. [44] Przyczyną późnej diagnozy u osób starszych są słabo wyrażone objawy, ograniczone i mało nasilone zmiany w badaniu histopatologicznym, zaburzenia poznawcze prowadzące do bagatelizowania występujących objawów czy narastająca z wiekiem seronegatywność. [45]

W przypadku badań serologicznych można mieć do czynienia z wynikami fałszywie dodatnimi oraz fałszywie ujemnymi. Fałszywie pozytywne wyniki uzyskuje się w przypadku reakcji krzyżowych przeciwciał podczas infekcji jelitowych, marskości wątroby, niewydolności serca czy hipergammaglobulinemii. Fałszywie negatywne wyniki mogą wynikać z niedoboru przeciwciał w klasie IgA, co jest częste u osób z celiakią (rekomenduje się wtedy oznaczenie IgA całkowitego) czy stosowanie niskoglutenu diety. Celiakia seronegatywna stanowi około 6-28% wszystkich przypadków. [46] Diagnoza staje się również utrudniona z powodu wszechobecnej mody na stosowanie diety bezglutenowej. W przypadku stosowania przez pacjenta diety bezglutenowej oraz negatywnego wyniku badań serologicznych wykonuje się typowanie HLA DQ2/DQ8 i w przypadku pozytywnego wyniku typowania wykonuje się prowokację glutenem w ilości 3g/d przez 8 tygodni i powtarza badania serologiczne. Niestety jak już wcześniej wspomniano część chorych jest seronegatywna, a część zdrowej populacji posiada haplotypy HLA DQ2/DQ8 [28,46,23]. W przypadku badań histopatologicznych bardzo ważne jest pobranie w odpowiedni sposób materiału; to jest odpowiednią ilość wycinków: minimum cztery z dalszego odcinka dwunastnicy i dwa z opuszki z uwagi na mozaikowość błony śluzowej. Niestety nadal wiele badań endoskopowych odbywa się bez biopsji, co opóźnia rozpoznanie. Kluczowa jest interpretacja stanu klinicznego, statusu serologicznego, spożywania glutenu oraz oceny histologicznej. Pacjent z destrukcją kosmków jelitowych w skali Marsha 1 może chorować na chorobę trzewną. [47] Problem diagnostyczny stwarzają pacjenci z destrukcją kosmków w badaniu histologicznym oraz ujemnymi badaniami serologicznymi w kierunku celiakii. Jednostka ta nazywana jest seronegatywną atrofią kosmków (SNVA – seronegative villous atrophy) i jej przyczyną może być celiakia; są to osoby, które ograniczyły spożycie glutenu, z niedoborem przeciwciał IgA, w trakcie immunosupresji lub z rozpoznaniem chłoniakiem T komórkowym. Inne przyczyny nie wynikające z celiakii to choroba Leśniowskiego – Crohna, zapalenie żołądka i jelit, giardioza, choroba przeszczep przeciwko biorcy – GVHD (graft versus host disease), enteropatia HIV, mykobakteriozy, choroba Whipple'a, również leki takie jak NLPZ, Metotrexat oraz blokery receptora angiotensyny 2 – olmesartan. Część przypadków jest o nieznanej etiologii. W celu

postawienia rozpoznania SNVA niezwiązanego z chorobą trzewną należy wykonać typowanie HLA oraz ustalić status serologiczny HIV, wykluczyć mykobakteriozę czy wpływ działania leków.[48]

W diagnostyce różnicowej należy także brać pod uwagę inne choroby glutenozależne takie jak nieceliakalna nadwrażliwość na gluten – NGCS – (non-celiac gluten sensitivity) oraz alergia na pszenicę.

Tabela 4 .Diagnostyka różnicowa celiakii, NCGS oraz alergii na pszenicę –opracowane na podstawie [49, 50]

	Celiakia	NCGS	Alergia na pszenicę
Czas od ekspozycji na gluten do wystąpienia objawów	Dni – tygodnie	Godziny- dni	Minuty – godziny
Patogeneza	Autoimmunologiczna Limfocyty Th1	Wrodzona immunizacja	Th2: odpowiedź alergiczna
Obecność HLA – DQ2/DQ8	Tak – ponad 95%	Tak – 50%	Nie
Przeciwciała	Anty –tTG	IgG – AGA – 56%	Nie
Enteropatia	Tak	Minimalna – Marsh 0-1	Minimalna
Objawy	Jelitowe i pozajelitowe	Jelitowe i pozajelitowe	Jelitowe i pozajelitowe
Komplicacje	Zwiększona śmiertelność	nieznane	Wstrząs anafilaktyczny

NGCS rozpoznaje się po wykluczeniu celiakii oraz alergii na pszenicę. Jak do tej pory jedynym leczeniem choroby trzewnej jest ściśle przestrzeganie diety bezglutenowej [34].

Zespół ekspertów z British Society of Gastroenterology opracował rekomendacje dotyczące wykonywania badań kontrolnych u dorosłych osób z rozpoznaną celiakią co przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Rekomendacje British Society of Gastroenterology – badania kontrolne osoby dorosłej z celiakią.
Opracowane na podstawie [51]

Tuż po rozpoznaniu
- poziom wapnia, witaminy D oraz alkalicznej fosfatazy - badanie gęstości kości – pacjenci po 55 r.ż oraz u osób zagrożonych wystąpieniem osteoporozy
12 miesięcy po rozpoznaniu
- tTG, EMA lub DGP - morfologia, ferrytyna, witamina B12 i kwas foliowy, wapń oraz fosfataza alkaliczna - wykluczenie chorób tarczycy – TSH, FT3, FT4 - AspAT, AlAT – wykluczenie choroby wątroby - Wykluczenie cukrzycy – glikemia na czczo - Wywiad dietetyczny - Ponowna biopsja dwunastnicy w razie potrzeby
Kolejne lata
- Badania krwi jak wyżej oraz wywiad dietetyczny w zależności od stanu pacjenta - Kontrolne badanie gęstości kości u osób zagrożonych osteoporozą i powyżej 55 r.ż co 2 lata - Biopsja dwunastnicy w zależności od stanu pacjenta lub po 2-5 latach

1.2 SIBO – etiopatogeneza i problemy diagnostyczne

W przewodzie pokarmowym człowieka bytuje wiele gatunków mikroorganizmów, włączając w to bakterie, wirusy oraz grzyby; liczba komórek jelitowej mikrobioty ogólnie wynosi 10^{14} komórek w porównaniu do liczby komórek organizmu w liczbie 10^{13} . Górny odcinek przewodu pokarmowego jest praktycznie pozbawiony bakterii – od 0 do 10^3 mikroorganizmów z uwagi na barierę kwasu solnego w żołądku. [52]

Proporcja gatunków bakterii beztlenowych wzrasta w kierunku dystalnym przewodu pokarmowego. Liczba bakterii tlenowych i beztlenowych staje się równa w jelicie krętym. Zaburzenia w zakresie flory bakteryjnej niesie za sobą implikacje kliniczne. Jednym z takich zaburzeń jest SIBO – przerost bakteryjny jelita cienkiego – (small intestinal bacterial overgrowth). [6]

SIBO definiowany jest jako wzrost liczby bakterii jelicie czczym ponad 10^5 komórek w aspiracie jelitowym. Jednakże z uwagi na trudności we właściwym zmierzeniu i stwierdzeniu kolonizacji powoduje, że do diagnostyki SIBO wykorzystuje się wodorowe testy oddechowe. [53] Inna definicja natomiast mówi,

że SIBO można rozpoznać przy wzroście CFU powyżej 10^3 bakterii w jelicie czczym. Warunek – dany gatunek bakterii nieobecny jest w ślinie oraz soku żołądkowym lub jest podobny do tego w jelicie grubym. [54]

Częstość występowania SIBO u osób dorosłych nie jest do końca znana, ale uważa się, że dotyczy od 7 do 22% populacji, [55] natomiast u strasznych osób starszych odsetek ten waha się od 2,5% do 90%; dotyczy to głównie pacjentów ze współistniejącą nietolerancją laktozy. [56]

SIBO występuje w momencie gdy mechanizmy kontrolujące homeostazę mikrobiomu jelitowego zostają zaburzone. Wymieniane są tutaj dwa procesy predysponujące do wzrostu bakterii jelicie cienkim. Pierwszy to zmniejszenie lub zniesienie wytwarzania kwasu solnego w żołądku, drugi – zaburzenia motoryki jelit. Również zaburzenia funkcji immunologicznych oraz anomalie w zakresie anatomii jelit predysponują do wystąpienia SIBO. Stąd wniosek, że SIBO staje się czynnikiem spustowym do reakcji zapalnej błony śluzowej jelita; może dochodzić do mikroskopowego zapalenia błony śluzowej. [57] Nadmierna proliferacja bakterii powoduje różnego rodzaju zmiany. Bakterie przeprowadzają procesy fermentacji disacharydów w rezultacie czego powstaje duża ilość gazów takich jak wodór, dwutlenek węgla czy metan, które są odpowiedzialne za wystąpienie wzdęcia; fermentacja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych powoduje osmotyczne ściąganie wody do światła jelita, w następstwie czego występuje biegunka. Pod wpływem bakterii dochodzi także do dekoniugacji soli kwasów żółciowych, zaburzeń we wchłanianiu tłuszczu, co staje się przyczyną tłuszczowych stolców. Z kolei zmniejszone wchłanianie tłuszczów powoduje niedobory witamin A, D i E. Nie zaobserwowano niedoborów witaminy K, która jest wytwarzana przez bakterie, natomiast niedobór witaminy B12 występuje z powodu zwiększonej konsumpcji bakteryjnej. [6]

Fizjologiczne mechanizmy zapobiegające SIBO to prawidłowa motoryka jelita cienkiego, wytwarzanie kwasu solnego, sekrecja soku trzustkowego i żółci oraz lokalne i ogólnoustrojowe mechanizmy immunologiczne. Istnieje wiele czynników sprzyjających SIBO m.in. zaburzenia w obrębie bariery kwasu solnego typu by-pass żołądkowy, hypochlorhydria, gastrektomia czy stosowanie PPI (inhibitorów pompy protonowej). Inne to zaburzenia w obrębie błony śluzowej jelita czy ogólnie jego funkcji; wymienić należy tutaj neuropatię trzewną, amyloidozę, gastroparę, enteropatię popromienną, różnego rodzaju zespoły paranowotworowe czy skutek stosowania opioidów. Zmiany anatomiczne także przyczyniają się do rozwoju SIBO; najczęściej jest to zespół krótkiego jelita, uchyłkowatość, przetoki, operacje metodą Roux-Y czy resekcja zastawki krętniczo – kątniczej. Mechanizmy immunologiczne to m.in. niedobór przeciwciał w klasie IgA czy niedobory odporności T komórkowej. Również choroby ogólnoustrojowe takie jak IBS (zespół jelita drażliwego), marskość wątroby, otyłość, cukrzyca czy choroba trzewna. [58]

Dane literaturowe pokazują, że u około 62% pacjentów z zapalnymi chorobami jelit, takimi jak colitis ulcerosa czy choroba Leśniowskiego – Crohna współistnieje SIBO, co może być manifestowane jako

zaostrenie choroby i skutkuje wzrostem stężenia kalprotektyny w stolcu. Zaburzenia pasażu jelitowego w przypadku pacjentów z rozpoznaną cukrzycą predysponują do występowania SIBO. Niektóre badania sugerują rolę osi mikrobiota – jelito – mózg w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i zapalnych. SIBO często jest diagnozowane u pacjentów z chorobą Parkinsona czy stwardnieniem rozsianym.[59] Istnieje także związek pomiędzy występowaniem otyłości i SIBO. Pacjenci z otyłością znacznego stopnia mają wyższe ryzyko wystąpienia SIBO w przeciwieństwie do pacjentów z masą ciała w normie. Związane jest to z zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego u osób otyłych; wzrost ilości bakterii w jelicie cienkim może potencjalnie prowadzić do wzrostu aktywności pro-zapalnej i w konsekwencji do otyłości i powstaje w ten sposób błędne koło. Badania pokazują wysokie stężenia metanu w testach oddechowych korelujące z wysokim BMI oraz poziomem tkanki tłuszczowej. [60] W przypadku NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) częstość występowania SIBO wynosi 37,9%. Przyczyna występowania SIBO w skojarzeniu z NAFLD nie została do końca wyjaśniona. Wydaje się, że patomechanizm jest wieloczynnikowy i związany jest ze wzrostem aktywności zapalnej w SIBO jako rezultat produkcji przez bakterie LPS (lipopolisacharydu). Pacjenci z SIBO oraz NAFLD mają wyższy poziom endotoksyn bakteryjnych w surowicy, wyższą ekspresję czynnika transkrypcyjnego dla komórek CD14 i czynnika jądrowego (NF) κ/β w wątrobie oraz wyższą ekspresją receptora dla białka TLR4. Dodatkowo występowanie SIBO może prowadzić do występowania stłuszczenia wątroby; bakterie indukują gromadzenie depozytów tłuszczowych w wątrobie poprzez alternatywny metabolizm choliny.[61] Przyjmowanie leków z grupy inhibitorów pompy protonowej jest uznawane jako czynnik ryzyka wystąpienia SIBO, jednakże tylko wtedy, gdy rozpoznanie było postawione na podstawie bardzo dokładnych testów czyli badania aspiratu jelitowego. [62] Niektóre badania pokazują jednak że liczba izolowanych bakterii z jelita jest podobna u pacjentów z SIBO i bez, mamy tu do czynienia z koncepcją zmian pH soku żołądkowego co mogłoby promować rozwój SIBO, jednak stwierdzenie to nie jest do końca wyjaśnione. Podaje się także, że czynniki sprzyjające to występowanie równocześnie cukrzycy typu 2 oraz wieku powyżej 60 lat, natomiast czynniki protekcyjne to BMI powyżej 22 kg/m² oraz zapalenie błony śluzowej żołądka. [63]

Do częstych objawów SIBO należą wzdęcia, dyskomfort w jamie brzusznej, przewlekłe biegunki czy tłuszczowe stolce. Ponadto możliwe jest niedożywienie, niedokrwistość z niedoboru witaminy B12, utrata masy ciała a u dzieci zaburzenia wzrastania.[52] Istnieje także powiązanie SIBO z zaburzeniami neurologicznymi takimi jak zaburzenia funkcji poznawczych, zaburzenia pamięci krótkotrwałej czy problemy z koncentracją. [64]

Tabela 6. Mechanizmy odpowiedzialne za deficyty składników odżywczych w przebiegu SIBO. Opracowane na podstawie : [58]

Mechanizmy prowadzące do niedoborów składników odżywczych w przebiegu SIBO	
Składnik	Mechanizm
Tłuszcze	• Dekoniugacja soli kwasów żółciowych powoduje zmniejszenie dostępności kwasów żółciowych do tworzenia miceli • Produkcja toksyn takich jak kwas litocholowy może zmniejszać absorpcję
Węglowodany	• Produkcja toksyn takich jak kwas litocholowy może zmniejszać absorpcję • Degradacja cukrów przez bakterie • upośledzenie aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego: disacharydazy i hydrolazy
Białka	• Produkcja toksyn takich jak kwas litocholowy może zmniejszać absorpcję
Witamina B12	• Konsumpcja witaminy B12 przez bakterie • Zmniejszenie wchłaniania witaminy B12 w ileum terminale
Witaminy A,D,E	• Dekoniugacja kwasów żółciowych powoduje zmniejszenie dostępności kwasów żółciowych do wchłaniania tłuszczów.

Celem diagnostyki SIBO należy przeprowadzić dokładny wywiad z pacjentem aby określić czynniki ryzyka takie jak bóle brzucha czy wcześniejsze zabiegi operacyjne. Obserwuje się także związek SIBO z IBS. Badanie fizykalne oraz badania laboratoryjne często bywają niespecyficzne; występują niedokrwistość z niedoboru witaminy B12, cechy niedożywienia takie jak limfopenia, niski poziom albumin czy wzrost poziomu witaminy K. Badanie aspiratu treści jelitowej zaliczane jest do badań bezpośrednich, do metod pośrednich należą wodorowe testy oddechowe. Jak już wcześniej wspomniano do rozpoznania SIBO w badaniach bezpośrednich aspiratu liczba bakterii musi wynosić powyżej 10^5 CFU/ml. Badanie to jest uznawane jako złoty standard w diagnostyce SIBO [57,65]

Wodorowe testy oddechowe są łatwo dostępne, niedrogie i nieinwazyjne dla pacjentów. Pacjent zostaje obciążony roztworem cukru np. laktulozy czy glukozy i poddawany pomiarom stężenia wodoru w wydychanym powietrzu w jednostce czasu.[66] Wodorowe testy oddechowe opierają się na założeniu fermentacji bakteryjnej węglowodanów w świetle jelita; powstający gaz jest absorbowany w jelicie grubym do krwioobiegu, skąd jest transportowany do płuc i wydychany na zewnątrz. Stężenie wodoru w wydychanym powietrzu mierzy się za pomocą specjalistycznego urządzenia. [67] Wynik testu z użyciem laktulozy uważa się za dodatni, jeśli stężenie wodoru wzrośnie o 20 ppm w stosunku do wartości wyjściowych w ciągu 90 min.[52]

W leczeniu SIBO zastosowanie ma ryfaksymina, czyli półsyntetyczna pochodna ryfampicyny z szerokim spektrum działania przeciwko bakteriom gram dodatnim i gram ujemnym. Antybiotyk ten wykazuje obojętny wpływ na prawidłową florę bakteryjną jelit oraz praktycznie w ogóle nie jest absorbowany ze światła przewodu pokarmowego.[68] Inne antybiotyki stosowane w terapii SIBO to najczęściej metronidazol w monoterapii lub w skojarzeniu z trimetoprimem-sulametoksazolem albo cefaleksyną, fluorochinolony (ciprofloksacyna, norfloksacyna) czy pochodne penicylinowe (amoksycylina z kwasem klawulanowym). [57] Dane literaturowe pokazują także korzyści ze stosowania bakterii probiotycznych z grupy kwasu mlekowego w leczeniu SIBO oraz w zmniejszaniu komplikacji tego schorzenia. [69]

Problemy w diagnozowaniu SIBO.

Wodorowe testy oddechowe są prostym i nieinwazyjnym narzędziem w diagnostyce SIBO. Istnieją jednak czynniki wpływające na przebieg testu zależne od sprzętu oraz od pacjenta czyli: palenie papierosów, dieta czy stosowanie leków. Pacjent może nieświadomie wpłynąć na procesy fermentacji bakteryjnej poprzez dietę bogatą w węglowodany czy żucie gumy przed badaniem. [70]. Przygotowanie pacjenta do badania w istotny sposób wpływa na wynik testu; 4 tygodnie przed wykonaniem badania pacjent nie powinien przyjmować antybiotyków, 24 godziny przed nie jeść produktów wysokowęglowodanowych, przez 12 godzin być na czczo oraz przez 2 godziny przed testem nie palić tytoniu. [67] Dokładność testu powiązana jest ze zdolnością bakterii do procesów fermentacyjnych z uwalnianiem wodoru. Każda ingerencja w skład mikrobiomu jelitowego, zwłaszcza poprzez stosowanie antybiotyków wpływa negatywnie na wynik testu i może być przyczyną wyniku fałszywie ujemnego.[71] Stosowanie środków przeczyszczających czy roztworów elektrolitowych używanych do przygotowania pacjenta do badań endoskopowych czy zabiegów operacyjnych w znaczny sposób wpływa na stan flory jelitowej; zwłaszcza kombinacja wlewów doodbytniczych i środków przeczyszczających powoduje znaczne obniżenie zdolności do produkcji wodoru w wyniku eliminacji bakterii z biegunkowym stolcem, co również może skutkować uzyskaniem wyniku fałszywie ujemnego. Sugeruje się 4 tygodniowy odstęp pomiędzy stosowaniem środków przeczyszczających a badaniem. [72] Inną przyczyną uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników jest fakt, że u około 15 -20% populacji występuje brak flory bakteryjnej produkującej wodór. Testy fałszywie dodatnie mają miejsce w przypadku fermentacji użytego roztworu przez bakterie bytujące w jamie ustnej. Zastosowanie roztworu 1% chlorheksydyny oraz prawidłowa higiena jamy ustnej stanowi prewencję przed wynikami fałszywie dodatnimi. [71] W przypadku wykonywania testu z glukozą jako substratem może dochodzić do szybkiego pasażu glukozy do jelita grubego oraz fermentacji bakteryjnej w okrężnicy, czego skutkiem również może być wynik fałszywie pozytywny. [73] Z drugiej strony glukoza w dużych ilościach jest absorbowana w jelicie czczym, dlatego trudno jest wytłumaczyć tak do końca przyczynę wyników pozytywnych. Sugeruje się, że poleganie na wyniku glukozowego testu oddechowego może nie

doszacować SIBO w małej grupie pacjentów, u których przerost bakteryjny ogranicza się tylko do jelita krętego. Polegając natomiast na teście opartym na laktulozie może dochodzić do przediagnowania w wyniku wzmożonej fermentacji w okrężnicy u pacjentów bez występowania SIBO. Laktuloza jest disacharydem nie podlegającym absorpcji w jelicie cienkim. [74] Wykrywanie SIBO sprawia wiele trudności diagnostycznych, nie ma ponadto odpowiedniego testu, który by był swoisty dla SIBO.[75] Kłopoty diagnostyczne sprawiają także pacjenci po zabiegach operacyjnych np. operacji Roux -Y z uwagi na bardzo szybki pasaż jelitowy, który jest o wiele krótszy niż u pacjentów, którzy nie przechodzili zabiegów operacyjnych. W przypadku tych pacjentów diagnozowanie SIBO na podstawie analizy aspiratu również jest obarczone dużym ryzykiem błędu z powodu zmian stosunków anatomicznych [76]. Innym, istotnym czynnikiem wpływającym na wynik testu jest technika prowadzenia wydechu; pomiar stężenia wodoru musi być przeprowadzony w powietrzu pęcherzykowym, w przeciwnym wypadku pomiar będzie zakłócony poprzez analizę powietrza z przestrzeni martwej. Palenie tytoniu dodatkowo powoduje wzrost stężenia wodoru w wydychanym powietrzu o 2%, natomiast ćwiczenia fizyczne powodują spadek w wyniku hiperwentylacji. [72] Co istotne, bardzo podobne objawy do SIBO, czyli bóle brzucha, wzdęcia czy biegunki zwłaszcza u pacjentów po kolektomii daje współistniejące SIFO – (small intestinal fungal overgrowth), który to może być wykrywany tylko za pomocą analizy aspiratu jelitowego. Na podstawie samych objawów klinicznych jest bardzo trudno różnicować SIBO i SIFO. [77] Dodatkowo wodorowy test oddechowy z wykorzystaniem glukozy w przypadku uzyskania wyniku dodatniego ma swoistość około 83%. Różnicowanie SIBO oraz innych przyczyn biegunek często wymaga wielu badań dodatkowych. [78]

1.3 Badania proteomiczne.

Techniki spektrometryczne opierają się na przeszukiwaniu baz danych sekwencji białek za pomocą widm generowanych przez proteolityczne rozszczepianie białek będących przedmiotem badań. [79] Profilowanie peptydowe oraz ocena dynamiki proteomu jest kluczowe dla zrozumienia zachowań komórek w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne oraz wewnętrzne i utrzymanie homeostazy. Przez ostatnie 20 lat spektrometria mas stała się bardzo użytecznym narzędziem do identyfikacji oraz charakteryzacji protein. [80] Nowa niezależna od danych metoda ich gromadzenia, która koncentruje się na maksymalizacji ilości danych zebranych dla proteomu poprzez szybkie przełączanie pomiędzy niskimi i podwyższonymi energiami kolizji umożliwia jednocześnie ocenianie wielu białek docelowych. [81] W celu dokonania analizy białek metody proteomiczne wykorzystują rutynowo trawienie białek na mniejsze elementy np. peptydy, które następnie są separowane przez chromatografię oraz rozpylane bezpośrednio do spektrometru mas umieszczonego na wylocie z kolumny chromatograficznej w celu analizy peptydów przy użyciu techniki znanej jako zależność od danych. [82] Obecnie masa molekularna peptydów lub innych białek może być dokładnie oszacowana przez metodę spektrometrii jonizacji elektrospreju (electrospray

ionisation – ESI) oraz MALDI -TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight). Metody te umożliwiają ustalenie sekwencji aminokwasów w peptydach, nawet po ich potranslacyjnych modyfikacjach. Zastosowanie spektrometrii MALDI - TOF umożliwia identyfikację peptydów o masie cząsteczkowej do 100 kDa. [83] Możliwość zidentyfikowania oraz określenia białek występujących w płynach ustrojowych może dostarczyć ważnych klinicznych, diagnostycznych i prognostycznych informacji o domniemanych biomarkerach różnych chorób. W odniesieniu do diagnozy płynu ustrojowego takie jak krew, ślina, mocz itp. wydają się bardzo przydatne, ponieważ ich badania są kluczowe dla postawienia rozpoznania, a jednocześnie są niedrogie, małoinwazyjne oraz proste do przeprowadzenia. [84] Biomarkery są to metaboliczne punkty końcowe. Badania nad zmienionymi poziomami tych związków mogą prowadzić do nowych celów terapeutycznych lub nadzoru nad interwencją dietetyczną w przypadku wielu chorób. W przypadku celiakii nie ma jednoznacznie określonego biomarkera stosowanego w celu diagnostyki czy monitorowania choroby. [85]

Proteomika to powstający obszar badań postgenomicznych zakładający ogólną analizę białek z wykorzystaniem różnych technik. Trudności w zmianie struktury przestrzennej peptydów doprowadziły do rozwoju technik opierających się na trawieniu niefrakcjonowanych mieszanek peptydowych oraz identyfikacji otrzymanych białek. [86] Ta gałąź wiedzy zajmuje się białkami, a dokładniej białkami kodowanymi przez genom. Termin proteom został wprowadzony w 1994 r. przez Marca R. Wilkinsa. Proteomem nazywamy zestaw wszystkich białek występujących w danym organizmie w określonym czasie. [87] Zasadniczym celem większości analiz proteomicznych jest identyfikacja jak największej ilości białek zapewniając przy tym wysoką jakość identyfikacji. [88] Dane literaturowe pokazują wykorzystanie badań proteomicznych do oznaczania białek zbóż [79,81] oraz pokarmów bezglutenowych [88] J. Stulik i wsp. dokonali analizy proteomicznej surowicy za pomocą spektrometru MALDI 13 dzieci z rozpoznana chorobą trzewną; zidentyfikowali ATP syntazę beta oraz 2 warianty enolazy alfa jako potencjalne biomarkery, jednakże badanie ograniczone było niską liczbą osób chorych. [89]

1.4 Komplikacje wynikające z braku rozpoznania i/lub leczenia

Choroba trzewna dotyka około 1% populacji; badania populacyjne dostarczają bardziej wiarygodne oszacowanie ryzyka populacyjnego związanego z rozpoznaniem. Niezdiagnozowana celiakia stanowi coraz częstszy problem kliniczny. Pomimo dostępnych wysoce specyficznych testów serologicznych stosunek liczby chorych niezdiagnozowanych do zdiagnozowanych wynosi 8:1 (Wielka Brytania), 3:1 w Finlandii, dlatego zdiagnozowani pacjenci to tylko wierzchołek góry lodowej. Pacjenci niezdiagnozowani mają niespecyficzne objawy lub ich brak. [90]

Rubio – Tapia A et al. w badaniu kohortowym obejmującym ponad 9 tysięcy osób wykazali związek pomiędzy niezdiagnozowaną celiakią u ludzi młodych a wzrostem ryzyka zgonu. W ciągu ostatnich 50 lat

nastąpił wzrost występowania niezdiagnozowanej choroby trzewnej. [91] U osób starszych natomiast niezdiagnozowana celiakia ma ograniczone występowanie i nie wpływa na wzrost śmiertelności w porównaniu do grupy kontrolnej; najpewniej z powodu braku objawów lub słabo wyrażonej manifestacji klinicznej. [92]

Pewnym utrudnieniem w diagnostyce jest fakt, iż pacjenci nie zawsze prezentują objawy z przewodu pokarmowego; mogą to być np. niedokrwistość z niedoboru żelaza, osteoporoza, hipertransaminazemia czy objawy neurologiczne. Celiakię rozpoznano u 3,3% chorych prezentujących objawy IBS. [93] Inne objawy, które często współistnieją z niewykrytą celiakią to niedoczynność tarczycy, niski poziom ferrytyny oraz cholesterolu w surowicy krwi. [94];

Choroba trzewna może występować nawet u 5% pacjentów prezentujących niedobór żelaza lub kwasu foliowego; niedokrwistość jako objaw jest najprawdopodobniej wynikiem niedoborów pokarmowych. Dlatego sugeruje się kwalifikację do wykonania biopsji dwunastnicy u tych chorych. Alternatywą jest wykonanie testów serologicznych, które są małoinwazyjne. [95] Niedokrwistość z niedoboru żelaza może występować nawet u 69% nowo zdiagnozowanych pacjentów. Inne zaburzenia hematologiczne obserwowane w przebiegu choroby trzewnej to niedokrwistości niedoborowe z powodu zmniejszonego wchłaniania witaminy B12 oraz kwasu foliowego. Trombocytopenia występująca w przebiegu celiakii ma prawdopodobnie podłoże autoimmunologiczne; często skojarzona jest z zapaleniem rogówki i spojówek oraz błony naczyniowej oka. Częściej występującym zaburzeniem jest jednak nadpłytkowość, której etiologia jest nie do końca poznana, prawdopodobnie występuje wtórnie do krążących we krwi mediatorów zapalnych. Z kolei niedobór witaminy K może prowadzić do objawów koagulopatii w wyniku wydłużenia czasu protrombinowego oraz INR. Sugeruje się także wykonanie badań w kierunku celiakii u pacjentów z hiposplenizmem, który może występować nawet u 60% chorych. Jednym z najpoważniejszych powikłań hematologicznych jest rozwój chłoniaków, co zostanie omówione dalej. [96] W przebiegu celiakii aktywacja glutenospecyficznych limfocytów T w błonie śluzowej przewodu pokarmowego indukuje aktywację prozapalnych szlaków, co w następstwie powoduje wzrost mediatorów zapalnych, OB, CRP oraz endogennych czynników pirogennych. Reakcje te mogą prowadzić do niszczenia śródbłonna, zapalenia naczyń oraz miażdżycy. [97] Problem stanowi utrzymywanie się stanu zapalnego, co sprzyja występowaniu czynników promujących aterogenezę. Obecność prozapalnych mediatorów i substratów takich jak cytokiny aktywujące toll podobny receptor (TLR – toll – like receptor), IL1 i 8, TNF – α może prawdopodobnie ułatwiać i przyspieszać aterogenezę u chorych z celiakią, od momentu inicjacji aterogenezy przez inkorporację LDL, poprzez szerzenie i później pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej z powodu silnego nasilenia procesów zapalnych; istnieje potencjalny silny związek pomiędzy występowaniem celiakii a chorobą wieńcową. Dane literaturowe pokazują dwukrotnie wyższy odsetek występowania choroby wieńcowej u pacjentów z chorobą trzewną w porównaniu do populacji

ogólnej. Wczesne wykrycie i agresywne leczenie choroby trzewnej może zapobiec komplikacjom z układu sercowo – naczyniowego. [98]

Celiakii mogą towarzyszyć inne zaburzenia kardiologiczne bez współistniejących objawów z przewodu pokarmowego, zwłaszcza u młodych kobiet. Rozróżnia się kilka typów schorzeń, m.in kardiomiopatia, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie osierdzia oraz zaburzenia przewodnictwa. Pacjenci z chorobą trzewną mają zwiększone ryzyko wystąpienia idiopatycznej kardiomiopatii rozstrzeniowej oraz migotania przedsionków, do rzadszych powikłań należą wysięk osierdziowy i zapalenie osierdzia. Zaburzenia kardiologiczne próbuje się tłumaczyć niedoborami składników odżywczych, patologią w zakresie przepuszczalności jelit i wzrostem absorpcji antygenów oraz reakcji autoimmunologicznej z prezentowaniem antygenów zarówno w jelicie cienkim jak i myokardium. Dlatego niewyjaśnione arytmie mogą stanowić wskazanie do diagnostyki w kierunku celiakii. [99]

Choroby autoimmunologiczne mogą występować nie tylko u osoby chorej, ale również wśród członków rodziny. Związek pomiędzy cukrzycą typu 1 a chorobą trzewną jest obserwowany od kilku lat, na podstawie badań skriningowych z wykorzystaniem serologicznych markerów celiakii ustalono, że częstość współistnienia choroby trzewnej z cukrzycą typu 1 wynosi od 2 do 8%. Przyczyna współistnienia ze sobą chorób autoimmunologicznych nie została do końca poznana; prawdopodobnie są jeszcze inne czynniki niż genetyczne. Wiele przypadków celiakii skojarzonych z cukrzycą typu 1 nie manifestuje objawów gastroenterologicznych. Zaobserwowano wyższy odsetek zachorowalności na celiakię wśród krewnych I stopnia; wielu pacjentów nie jest zdiagnozowanych. Limfocyty reagujące na antygen komórek wyspowych GAD prezentują jelitowo-specyficzny receptor dla $\alpha 4\beta 7$ integryny, co sugeruje, że te autoreaktywne limfocyty pochodzą z jelit i również dochodzi do złamania tolerancji na autoantygen limfocytów jelitowych u pacjentów z cukrzycą rozpoznaną de novo. [100] Osoby leczone przeszczepem wysp trzustkowych są rutynowo poddawane badaniom skriningowym w kierunku autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, niewydolności nadnerczy oraz celiakii, gdyż zwłaszcza ta ostatnia nieleczona zaburza wchłanianie leków immunosupresyjnych. Ponadto prowadzi do występowania częstych hipoglikemii [101]

Osteoporoza jest jednym z częstszych powikłań choroby trzewnej. Częstość występowania osteoporozy oraz osteopenii u nowo zdiagnozowanych pacjentów wynosi nawet 75%. W przypadku osób dorosłych około 1/3 prezentuje osteoporozę, kolejna 1/3 osteopenię, a pozostali prawidłową gęstość kości. Przewlekły proces zapalny i zaburzenia wchłaniania w celiakii mogą prowadzić do zaburzeń metabolizmu kości i utratę składników mineralnych. Złamania w przebiegu osteoporozy mogą być związane z nierozpoznaną celiakią. [102] Etiologia jest wieloczynnikowa; zaburzenia wchłaniania wapnia oraz witaminy D występują z powodu utrudnienia wchłaniania kwasów tłuszczowych w wyniku atrofii kosmków. Dodatkowo wielu chorych z uwagi na nietolerancję laktozy ogranicza nabiał i produkty mleczne. Osoby chore z powodu niedożywienia często mają niedobór masy ciała, natomiast uogólnione zapalenie ze wzrostem cytokin

prozapalnych (IL1, 6, TNF) oraz stosunku RANKL/osteoprotegryny stymuluje osteoklastogenezę. Występujące w przebiegu niedożywienia zaburzenia hormonalne indukują kobiet brak miesiączki lub przedwczesną menopauzę, mężczyźni z kolei prezentują oporność na androgeny oraz wzrost prolaktyny, co promuje osteoporozę. [103] Istotnym czynnikiem jest regulacja hormonalna wchłaniania wapnia, gdzie zachowanie homeostazy uwarunkowane jest obecnością parathormonu (PTH), 1,25 – dihydroksywitaminy D oraz kalcytoniny. W momencie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia szybki wzrost poziomu PTH promuje wzrost obrotu kostnego i utratę masy kostnej. Nadczynność przytarczyc występuje u 27% dorosłych oraz u 12-54% dzieci ze świeżo rozpoznaną celiakią. Wysokie stężenia PTH zwiększają poziom 1,25 – dihydroksywitaminy D poprzez stymulację nerkowej 1 - α – hydroksylazy, enzymu odpowiedzialnego za konwersję 25-hydroksywitaminy D3 do 1,25 – dihydroksywitaminy D3. Inne czynniki, które mogą wpływać na obniżenie masy kostnej to tłuszczowe stolce, współistnienie innych chorób autoimmunologicznych np. choroba Hashimoto, rozpoznanie w późnym wieku, nieprzestrzeganie diety bezglutenowej czy brak aktywności fizycznej i palenie tytoniu. [104]. Celiakia zazwyczaj diagnozowana jest u osób młodszych z ewidentnymi objawami zespołu zaburzeń wchłaniania, jednak coraz częściej choroba występuje u osób starszych. Nuti R. i wsp. przeprowadzili badania dotyczące częstości występowania choroby trzewnej w populacji kobiet po menopauzie z osteoporozą; 24 z 255 chorych miały podwyższone przeciwciała anty tTG. Wykazano także, że pacjenci z niezdiagnozowaną celiakią mają większy obrót kostny, zaburzenia wchłaniania wapnia, niedobór witaminy D3 oraz wtórną nadczynność przytarczyc, co w konsekwencji prowadzi do osteoporozy. [105]

Istotnym problemem są także powikłania położnicze, włączając w to niepłodność czy komplikacje w przebiegu ciąży. Saccone G i wsp. dokonali metaanalizy 10 badań obejmujących 4844555 kobiet. Porównano kobiety z rozpoznaną celiakią z grupą kobiet zdrowych. Metaanaliza obejmowała kobiety zarówno leczone jak i niezdiagnozowane i wykazała wzrost ryzyka porodu przedwczesnego, zaburzenia wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, poronień oraz niskiej masy urodzeniowej, natomiast badania nie wykazały różnicy w występowaniu stanu przedrzucawkowego. Ponadto kobiety ze zdiagnozowaną chorobą trzewną i na diecie bezglutenowej w porównaniu do kobiet niezdiagnozowanych miały mniejsze ryzyko porodu przedwczesnego. Stosowanie diety bezglutenowej ma istotny wpływ na występowanie powikłań położniczych zmniejszając to ryzyko. [106] Powikłania położnicze obejmują ponadto nawracające utraty ciąży, które definiowane są jako 2 lub więcej poronienia występujące przed 10 tygodniem ciąży. Zaobserwowano wzrost miana przeciwciał anty - tTG u kobiet po kilku poronieniach; taka obserwacja może sugerować niekorzystny wpływ przeciwciał anty – tTG na przebieg ciąży, jednak nie rekomenduje się rutynowych badań przesiewowych. [107]. Obserwuje się związek pomiędzy obecnością haplotypu HLA – DQ2/DQ8 w populacji kobiet z nawracającymi poronieniami. Haplotypy te kodują białka odgrywające istotną rolę w prezentacji antygenów limfocytom T. Sugeruje się, że zaburzona równowaga pomiędzy pro i antyzapalnymi cytokinami we wczesnym okresie ciąży może prowadzić do spontanicznych poronień, a jak

już wcześniej wspomniano ponad 90% chorych na celiakię jest nosicielem haplotypu HLA – DQ2/DQ8. [108]. Rozważa się także wpływ niezdiagnozowanej choroby trzewnej u matki oraz ojca jako przyczynę powstawania bezobjawowego rozszczepu wargi i podniebienia; wada ta najprawdopodobniej jest spowodowana nieprawidłowym wchłanianiem kwasu foliowego lub zaburzeniami genetycznymi w przebiegu celiakii. [109]

Pacjenci z nierozpoznaną chorobą trzewną częściej niż osoby zdrowe poddawani są interwencjom chirurgicznym. Zabiegi operacyjne przed rozpoznaniem były związane z objawami, które ostatecznie doprowadziły do postawienia rozpoznania. Tonsilektomia zazwyczaj powiązana z utratą masy ciała, a apendektomia z niedokrwistością i nawracającymi bólami brzucha, co więcej w przypadku celiakii usuwany wyrostek nie jest zmieniony zapalnie. Również pacjenci ci częściej poddają się zabiegom kosmetycznym, co może wynikać z zaburzeń psychologicznych. [110]

Przełomy celiakalne zaliczane są do poważnych komplikacji choroby trzewnej. Przełom celiakalny jest to stan bezpośredniego zagrożenia życia charakteryzujący się masowymi zaburzeniami metabolicznymi, które obejmują hipoproteinemię oraz dyselektrolitemię. Ponadto przełom ten cechuje niedożywienie oraz nasilone biegunki, kiedyś charakteryzował się wysoką śmiertelnością. Etiopatogeneza nie do końca jest znana, prawdopodobnie przełom powstaje na skutek masywnego stanu zapalnego, a czynnikiem spustowym może być operacja, infekcja lub ciąża. [111]

Celiakia dietooporna jest definiowana jako uporczywe występowanie objawów zespołu zaburzeń wchłaniania oraz atrofii kosmków po roku ścisłego przestrzegania diety bezglutenowej. Istotne jest wykluczenie innych przyczyn enteropatii ze skróceniem kosmków, jeżeli rozpoznanie choroby trzewnej jest potwierdzone określa się fenotyp i klonalność limfocytów śródepitelialnych (IEL). Wyróżnia się dwa typy celiakii odpornej : RCDI i RCDII (refractory celiac disease). Typ I jest definiowany jako wzrost liczby limfocytów o normalnym fenotypie z powierzchniową ekspresją CD3 i CD8, typ II z kolei definiowany jest jako wzrost abnormalnych limfocytów charakteryzujących się brakiem powierzchniowych markerów CD3, CD8 i receptora TCR. Najczęstszy wiek występowania to około 50 lat, a częstość występowania w populacji osób chorych nie jest znana, [112] niektóre źródła podają, że dotyczy to 1% chorych. Hrdlickova i wsp. wykazała związek typu II z HLA oraz polimorfizmem pojedynczego nukleotydu rs2041570 na chromosomie 7 jako silny czynnik ryzyka progresji. Postuluje się locus 7p14.3 jako potencjalny gen mający wpływ na dysregulację ścieżek immunologicznych w RCDII. [113] Jako przyczyny progresji do celiakii odpornej należy wymienić nieprzestrzeganie diety bezglutenowej, wszechobecne źródła glutenu takie jak leki czy komunikanty, niedobory cynku, towarzyszące zapalenie trzustki czy w końcu błędna diagnoza. Często choroba trzewna dietooporna może dawać obraz trudnego do diagnozowania chłoniaka. [114] W przypadku RCDII wzrasta ryzyko wystąpienia jawnego chłoniaka – EATL (enteropathy –

associated T – cel lymphoma), a 33 do 55 % pacjentów z typem II rozwija chłoniaka w ciągu 5 lat od rozpoznania.[115]

Choroby nowotworowe należą do najbardziej poważnych powikłań i powinno się ich spodziewać, gdy odpowiedź na dietę bezglutenową nie jest osiągalna lub trwała. Chłoniaki zwłaszcza T komórkowe, oraz nowotwory jelita cienkiego i przełyku są często skojarzone z celiakią. Ryzyko wystąpienia nowotworu jest 2 krotnie wyższe niż w populacji ogólnej, w przypadku nowotworów układu pokarmowego ryzyko to jest 10 razy wyższe, natomiast w przypadku chłoniaków 43 razy wyższe. Związek pomiędzy nowotworami płaskonabłonkowymi łącznie z górnym odcinkiem przełyku czy krtani jest dobrze udokumentowany. Gruczolakoraki jelita cienkiego ogólnie są rzadkimi nowotworami, natomiast w celiakii ryzyko wystąpienia tego nowotworu jest 80 razy wyższe; kancerogeneza związana jest z długotrwałą enteropatią. [116] Pacjenci z celiakią także częściej manifestują obecność raków gruczolowych jelita grubego, zwłaszcza lewostronnych. [117] Chłoniaki EATL oraz nowotwory jelita cienkiego są skojarzone z chorobą trzewną; spadek ryzyka wystąpienia EATL zdiagnozowanego powyżej roku po rozpoznaniu celiakii może sugerować hipotezę mówią że przebudowa architektoniki śluzówki jelita cienkiego oraz redukcja aktywności immunologicznej w odpowiedzi na dietę bezglutenową działają protekcyjnie. Jednakże ryzyko wystąpienia raka gruczolowego jelita cienkiego, płaskonabłonkowego oraz chłoniaków z komórek T wzrasta powyżej 1 roku po rozpoznaniu. [118] EATL został rozpoznany w 2001 r, najczęstsza postacią jest typ I – postać klasyczna związana z celiakią – występuje w 80% przypadków, w 2008 r opisano typ II – wykazujący ekspresję CD56. Dane literaturowe pokazują, że rozwojowi chłoniaka T komórkowego sprzyja współistnienie celiakii odpornej, zwłaszcza II typu. Anomalie fenotypowe dotyczą braku obecności powierzchniowego kompleksu CD3-TCR i koreceptora CD8, kontrastujące do wewnątrzcytoplazmatycznej ekspresji cząsteczki CD3ε. Czasem dochodzi do klonalnej rearanżacji receptora TCRγ, aberracji chromosomów oraz rozprzestrzeniania limfocytów we krwi oraz lokalizacjach pozajelitowych takich jak skóra czy płuca, co świadczy o ich nowotworowym pochodzeniu. [119] Wykazano obecność limfocytów progenitorowych z podwójnym receptorem T oraz NK w epithelium jelita, które różnicują się z hematopoetycznych prekursorów na nowym szlaku niezależnym od czynnika Id2, ale zależnym od IL-15 i sygnałów NOTCH. Mutacje z zakresie genów kodujących białka JAK1 oraz STAT3 promują klonalną ekspansję limfocytów z rearanżacją receptora CD3 w odpowiedzi na IL15 oraz inne cytokiny aktywowane przez STAT3. IL-15 indukuje także nasiloną fosforylację białka STAT3 w liniach komórkowych RCDII z mutacjami JAK1 G1097D/C w porównaniu do limfocytów niezmutowanych, gdzie ten efekt nie następuje; opisane mutacje prowadzą do procesu kancerogenezy.[120] W chorobie trzewnej dochodzi do wzrostu stężenia IL -15. [25]

IL -15 w typie II celiakii dietoopornej promuje szlak sygnałowy antyapoptotyczny, zależny od czynników Bcl-2 i/lub Bcl -xl, ponadto IL-15 aktywuje białka JAK3 oraz STAT5, co powoduje wzrost ekspresji czynnika antyapoptotycznego Bcl- xl. [121]. Chłoniaki z komórek B również występują w chorobie

trzewnej; najczęściej są to rozlane chłoniaki z komórek B. Rozpoznanie chłoniaka przysparza trudności, ponieważ zwykle choroba lokalizuje się w jelicie krętym. Mogą występować owrzodzenia z krwawieniem, zwężenia czy guzy zamykające światło jelita. Niektóre chłoniaki przebiegają jako wieloogniskowe lub rozlane, ale ograniczone do błony śluzowej. Obserwuje się również limfadenopatię oraz perforacje jelita cienkiego. W badaniach histopatologicznych obecne są komórki nowotworowe, będące jednak trudne do wychwycenia w zmienionym zapalnie jelicie. [122]

W przypadku SIBO komplikacje wynikające z braku rozpoznania nie niosą tak poważnych implikacji jak w chorobie trzewnej. Najczęstsze komplikacje wynikające z SIBO to niedożywienie, niedokrwistość z niedoboru żelaza, niedobory witamin rozpuszczalnych w tłuszczach czy występowanie zespołu jelita drażliwego. SIBO może wywoływać zaburzenia neurologiczne pod postacią zaburzeń koncentracji, czy pamięci krótkotrwałej a u dzieci zaburzenia wzrastania. [57,64,52]. W przeglądzie literatury obserwuje się małą liczbę pozycji opisujących konsekwencje kliniczne wynikające z braku rozpoznania SIBO

Z uwagi na różnorodność objawów, skomplikowany przebieg kliniczny oraz poważne konsekwencje wynikające z braku rozpoznania oraz leczenia choroby trzewnej w niniejszej pracy podjęłam próbę wykazania obecności markera peptydowego w surowicy krwi pacjentów, co pozwoliłoby postawić szybciej rozpoznanie i zapobiec konwersji do chłoniaka w przyszłości. Z kolei w diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę SIBO z powodu podobnych objawów i częstego występowania w populacji. W diagnostyce obu jednostek chorobowych występują dylematy diagnostyczne, które utrudniają postawienie rozpoznania, dlatego uzyskanie nowego, małoinwazyjnego badania mogłoby się przyczynić do szybszego postawienia rozpoznania.

2. Cele pracy:

1. Porównawcza analiza proteomiczna surowicy krwi pacjentów pomiędzy grupami: celiakia/grupa kontrolna, SIBO/grupa kontrolna oraz celiakia/SIBO
2. Identyfikacja wykrytych białek
3. Ocena wybranych parametrów zapalnych, poziomu hemoglobiny, albumin oraz białka całkowitego w różnych grupach badanych
4. Podjęcie próby wyjaśnienia patogenezy choroby trzewnej i zespołu zaburzeń wchłaniania na podstawie zidentyfikowanych białek
5. Próba oceny, czy zidentyfikowane białka mogą służyć jako markery diagnostyczne.

3. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na Oddziale Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki, a prace nad projektem trwały od listopada 2016 do lutego 2019. Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – nr Uchwały: 927/16 z dnia 15 września 2016; Aneks nr 1.

3.1 Charakterystyka grupy badanej

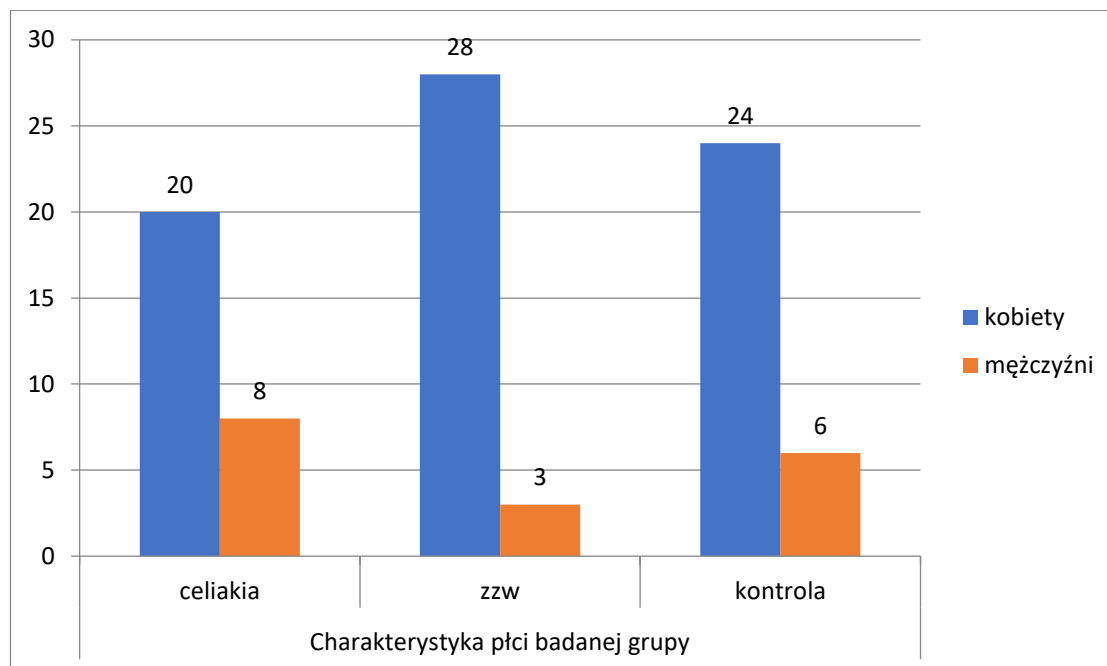
Do badania zostało zakwalifikowanych 89 pacjentów, zarówno kobiet jak i mężczyzn, prezentujących objawy zespołu zaburzeń wchłaniania hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki lub leczonych ambulatoryjnie w Poradni Gastroenterologicznej. Wśród zakwalifikowanych pacjentów do badania 28 miało rozpoznaną chorobę trzewną w momencie przyjęcia do szpitala lub rozpoznanie postawiono po zakończonej hospitalizacji; 31 pacjentów zostało zakwalifikowanych do grupy zespół zaburzeń wchłaniania – w badaniach wykluczono celiakię, natomiast wykazano obecność SIBO; trzecia grupa stanowi grupę kontrolną w liczbie 30 osób, gdzie wykluczono zarówno celiakię jak i obecność SIBO. Wszystkie osoby biorące udział w badaniu były pełnoletnie oraz wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu podpisując formularz świadomej zgody. Każdy pacjent został poproszony o wypełnienie ankiety dotyczącej obecnego stanu zdrowia, prezentowanych objawów, obciążeń rodzinnych; dodatkowo pacjenci z rozpoznaną chorobą trzewną poproszeni byli o wpisanie daty rozpoznania, wartości poziomu przeciwciał anti-tTG czy aktywności choroby w skali Marsha. Kryterium rozpoznania choroby trzewnej stanowi dodatnie miano przeciwciał anti tTG lub EMA/AGA oraz stopień w skali Marsha powyżej 3a, natomiast jako wyznacznik rozpoznania SIBO przyjęto wzrost poziomu wydychanego wodoru w pomiarze Gastrolyzerem między 30 a 60 minutą od obciążenia laktulozą o 12 ppm. Grupę kontrolną stanowią pacjenci prezentujący objawy zespołu zaburzeń wchłaniania przy braku obecności SIBO lub celiakii.

Kryteria włączenia do badania:

- Wiek 18 -70 lat
- Rozpoznana celiakia przed hospitalizacją lub w trakcie pobytu w szpitalu
- Obecność objawów jelitowych np. biegunki/zaparcia, bóle brzucha i inne
- Dodatni test w kierunku SIBO

Kryteria wykluczenia:

- Osoby w wieku poniżej 18 lat i powyżej 70 lat
- Rozpoznanie nieswoistej choroby jelit (choroba Leśniowskiego – Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego)
- Choroba nowotworowa obecnie lub w przeszłości
- Stan po radioterapii i/lub po chemioterapii.



Wykres 1. Struktura płci badanych grup

Tabela 7. Parametry antropometryczne badanej grupy (wartości średnie)

	Płeć	wiek (w latach)	wzrost (cm)	masa ciała (kg)
Celiakia	K	40 ± 14	167±8	56±10
	M	35 ±13	181±7	79±14
	Razem	39±14	171±10	63±15
Zzw	K	43±15	165±5	63±13
	M	31±7	184±3	81±2
	Razem	42±15	167±7	65±14
kontrola	K	36±11	165±5	68±21
	M	45±15	182±10	88±25
	Razem	37±12	169±9	80±23

3.2 Metodyka badań.

Podczas hospitalizacji u osób zakwalifikowanych do badania wykonywano rutynowe badania krwi oraz badania endoskopowe, u każdego pacjenta wykonywano badania przeciwciał anty tTG oraz zabezpieczono dodatkowo 7,5 ml krwi – próbówka na skrzep, następnie preparatyka materiału w celu uzyskania surowicy odbywała się w Pracowni Endokrynologii Molekularnej przy Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych. Surowicę po odwirowaniu (15 minut, prędkość 4000 obr/min) przechowywano w temp. – 80 stopni Celsjusza, a następnie poddano analizie proteomicznej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Analiza została wykonana za pomocą spektrometru mas MALDI – TOF/TOF firmy Bruker

Standardowo badanie proteomiczne składa się z kilku etapów:

1. Izolacja i rozdział białek
2. Identyfikacja
3. Analiza sekwencji białka

Powszechnie stosowaną metodą rozdziału białek jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC high – performance liquid chromatography) Najważniejszym elementem systemu jest kolumna – w tym miejscu jest dokonywana separacja. Do identyfikacji białek wykorzystano spektrometrię mas – nowoczesną technikę analityczną, która umożliwia dokładny pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Pierwszym etapem jest zawsze jonizacja peptydów. Technika wykorzystana do celu jest jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy (MALDI, matrix assisted laser desorption ionisation), w której zastosowano wiązkę lasera o tak dobranej energii, aby nie doprowadzić do fragmentacji cząstek, a jedynie do ich wybicia z matrycy oraz elektrorozpylenie (ESI, electrospray), opierające się na rozpyleniu cieczy zawierającej badaną substancję w polu elektrycznym charakteryzującym się wysokim napięciem. Głównym zadaniem układu pomiarowego w badaniach proteomicznych jest identyfikacja składu białek w próbce, stąd stosowane są systemy łączące składające się ze spektrometru oraz HPLC – LC-MS, czyli wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wszystkie frakcje białkowe schodzące z kolumny chromatograficznej są poddane jonizacji i wprowadzane do spektrometru. [87] W badaniach matrycą jest pochodna aromatycznych kwasów karbolowych nienasyconych – kwasu cynamonowego. [123]

Istotnym punktem badań było zachowanie należytej staranności, próbki były przenoszone w rękawiczkach aby zapobiec zanieczyszczeniu materiałem biologicznym z palców osoby wykonującej oznaczenia, używano jednorazowych końcówek do pipet, a przy preparatyce krwi skracano jak najbardziej czas przebywania próbki w temperaturze pokojowej, co miało zapobiegać ewentualnej proteolizie białek.

Do badania przygotowano 89 próbek, które zostały podzielone na 3 grupy – choroba trzewna 28 osób, zespół złego wchłaniania 31 osób oraz grupa kontrolna 30 osób. Wszystkie surowice przechowywane były

w identycznych próbkach oraz do analiz użyto tego samego rodzaju sprzęt laboratoryjny. W celu odpowiedniego przygotowania materiału, czyli odsolenia oraz zagęszczenia użyto metody bazującej na wykorzystaniu końcówek do pipet ZipTip C18. Następnie każdą badaną próbkę zmieszano z matrycowym roztworem α – cyjoano – 4- hydroksycynamonowego kwasu (0,3 g/l HCCA w roztworze zawierającym 2:1 etanol: aceton) w stężeniu 1:10. Jeden mikrolitr mieszaniny próbki i roztworu matrycowego zabezpieczono w celu wykonania analizy i pozostawiono do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Materiał od wszystkich trzech grup pacjentów analizowano w kolejności losowej aby zminimalizować możliwość wystąpienia błędu. Do analizy wykorzystano spektrometr UtrafleXtreme MALDI – TOF/TOF firmy Bruker Daltonics. Kalibrację widm spektrometrii masowej dokonano za pomocą mieszaniny Peptide Calibration Standard oraz Peptide Calibration Standard II w stosunku 1:5. [124]

Spektra widm kalibrowano zestawem Peptide Calibration Standard.

Wzorce peptydowe surowicy krwi poddano ponadto wielowymiarowej analizie statystycznej, która uwzględnia jednocześnie wiele zmiennych i bierze pod uwagę korelacje między zmiennymi. Klasyfikacja badanych próbek wykonana została za pomocą trzech algorytmów: Genettic Algorithm – GA, Quick Classifier oraz Supervised Neural Network – SNN. Obliczono dodatkowo dwa wskaźniki mówiące o wydajności modelu: walidację krzyżową oraz zdolność rozpoznawania. [125]

3.3. Analiza statystyczna

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem spektrometru MALDI zostały poddane analizie statystycznej przy pomocy programu ClinProTools 3.0. Program ten tworzy modele w oparciu o wyżej wymienione algorytmy; są to osobne metody obliczeniowe. Uzyskane modele umożliwiają klasyfikację grup objętych badaniem, zaś walidacja krzyżowa jest metodą pozwalającą na ocenę działania klasyfikatora wykorzystującego określone parametry w oparciu o konkretne dane; zdolność rozpoznawania to odsetek osób objętych badaniem prawidłowo przyporządkowanych do grup badanych oraz walidacja zewnętrzna. W trakcie analiz dokonano porównania grupy celiakia z zespołem zaburzeń wchłaniania, celiakia z grupą kontrolną oraz zespół zaburzeń wchłaniania z grupą kontrolną. Grupy te poddano analizie z wykorzystaniem opisanych algorytmów. Dokonano także identyfikacji peptydów. Najlepsza rozdzielczość metody jest dla peptydów poniżej 3500 kDa, dlatego też białka o masie cząsteczkowej wyższej nie zostały brane pod uwagę. [124]

W programie ClinProTools generowane są modele, które działają jak klasyfikatory. Celem generowania modelu jest opisanie klas widm generacji modelu w taki sposób, aby nowe widma mogły być sklasyfikowane. Program ClinProTools korzysta z trzech algorytmów, które różnią się między sobą metodologią, zaletami oraz wadami.

Algorytm GA opiera się na idei ewolucji, gdzie najlepiej przystosowane osobniki mają największe szanse na przetrwanie. Algorytm ten pracuje na populacji składającej się z różnorodnych kombinacji pików. Podczas selekcji najsilniejsze kombinacje pików są wybierane, a słabsze są dyskwalifikowane.

Algorytm SNN jest algorytmem opartym na prototypie klasyfikacji. Jeżeli bierze się pod uwagę zbiór podzielony na dwie klasy, algorytm „próbuję” identyfikować charakterystyczne widma poszczególnych klas. Widma te nazywane są prototypami i mogą być w jakiś sposób uznane jako prototypowe próbki poszczególnych klas.

Algorytm QC należy do jednowymiarowych sortujących algorytmów. Średnie z obszarów pików są przechowywane w modelu razem z pewnymi danymi statystycznymi, takimi jak wartość p w pewnych pozycjach pików. Do klasyfikacji w każdym położeniu pików obliczana jest i normalizowana odwrotna różnica powierzchni pików i klasy. [126] Dla stworzonych modeli wyliczono zdolność rozpoznawania oraz walidację krzyżową.

Walidacja krzyżowa (cross validation) to metoda statystyczna pozwalająca wybrać odpowiedni model stosowany do rozwiązywania problemów praktycznych analizy danych. Zatem walidacja krzyżowa jest kryterium decyzyjnym w wyborze odpowiedniego modelu [127]. Metoda walidacji krzyżowej polega na dzieleniu zbioru danych na mniejsze podzbiory czyli inaczej krotności. Następnie generowane są modele, które wyłączają kolejno dane z każdej podgrupy. Pierwszy wygenerowany model opiera się na wszystkich obserwacjach z wykluczeniem tych w pierwszej krotności podzbioru; drugi natomiast opiera się na wszystkich elementach drugiej próby z wykluczeniem drugiej krotności itp. W każdym uzyskanym modelu obliczany jest błąd na podstawie podgrupy wykluczonej ze wcześniejszych analiz. [128]

Walidacja zewnętrzna podobnie jak walidacja krzyżowa w trakcie generowania modelu przewiduje jego zdolność do rozpoznawania. W celu wyliczenia walidacji zewnętrznej należy załadować nowe zestawy widm dla każdej klasy np. kontrola/chorzy grupa 1, grupa 2 itp.). Widma walidacyjne nie powinny być brane pod uwagę przy generowaniu modelu i są przygotowane w taki sam sposób jak widma wykorzystywane do generacji modelu. Następnie klasyfikacja odbywa się względem danego modelu; wyklucza się tutaj widma szumowe oraz widma polimerów.[126]

Wykaz odczynników oraz sprzętu wykorzystanych do profilowania:

1. a-Cyano-4-hydroksycynamonowy kwas;
2. Protein Calibration Standard,
3. Peptide Calibration Standard II
4. Kolumna - 75 μ m I.D. x 15 cm, packed with Acclaim PepMap100
5. Etanol Bezwodny do HPLC
6. 2-Propanol do HPLC
7. Acetonitryl LC-MS
8. Kwas trifluorooctowy (TFA) >99%

4. Wyniki.

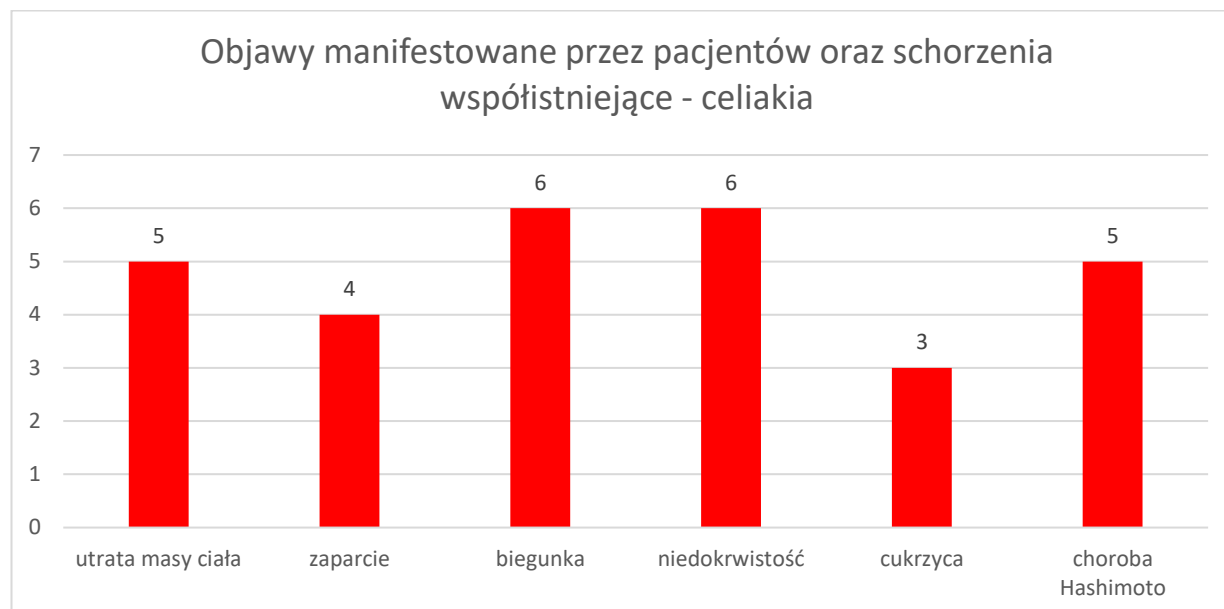
Analizie proteomicznej poddano próbki surowicy uzyskane od pacjentów z rozpoznaną chorobą trzewną przed lub w trakcie hospitalizacji (n=28), z SIBO – zespołem przerostu bakteryjnego jelita cienkiego (n=31), oraz grupy kontrolnej (n=30). Po odpowiednim przygotowaniu czyli odsoleniu, zateżaniu oraz frakcjonowaniu próbki analizowano przy pomocy spektrometru MALDI – TOF/TOF. Zakres mas wynosił od 1000 do 10000 Da. Do kalibracji został wykorzystany zestaw Peptide Calibration Standard (Bruker). Uzyskane widma zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem programu ClnProTools 3.0 (Bruker). Program ten dokonuje analizy m.in w oparciu o trzy algorytmy: Genetic Algorithm – GA, Quick Classifier - QC oraz Supervised Neural Network – SNN, stąd różnice w wynikach.

Dokonano porównania grupy z celiakią z grupą kontrolną, SIBO z grupą kontrolną oraz SIBO z chorobą trzewną z wykorzystaniem trzech modeli/algorytmów. Profile peptydowe zostały poddane ponadto analizie za pomocą testu statystycznego T, Wilcoxa oraz Anderson - Darling. Aby uznać pik za istotny statystycznie poziom istotności – p – value < 0,05 w przynajmniej 2 testach.

4.1 Charakterystyka kliniczna

- celiakia

Kryterium rozpoznania choroby trzewnej stanowi wynik w skali Marsh powyżej 3A – ocena biopsatu pobranego z dwunastnicy w trakcie rutynowo wykonywanej gastrokopii i/lub dodatnie miano tTG (jako wynik dodatni uznano wartość powyżej 20 RU/ml). Dodatkowo oznaczono przeciwciała przeciwko endomysium, kryterium rozpoznania – wynik dodatni. U wszystkich pacjentów z rozpoznaną chorobą trzewną wykonano test SIBO – kryterium włączenia do badania był ujemny wynik testu. Spośród 28 pacjentów 4 miało rozpoznana chorobę trzewną podczas hospitalizacji, u pozostałych osób rozpoznano chorobę trzewną kilka lat po hospitalizacji. Średnie stężenie CRP wynosiło 4,03 mg/dl, hemoglobiny 12,98 g/dl, stężenie albumin 4,28 g/dl, zaś średnia wartość białka całkowitego wynosiła 6,86 g/dl. Objawy manifestowane przez pacjentów z celiakią oraz choroby współistniejące przedstawia wykres 2.

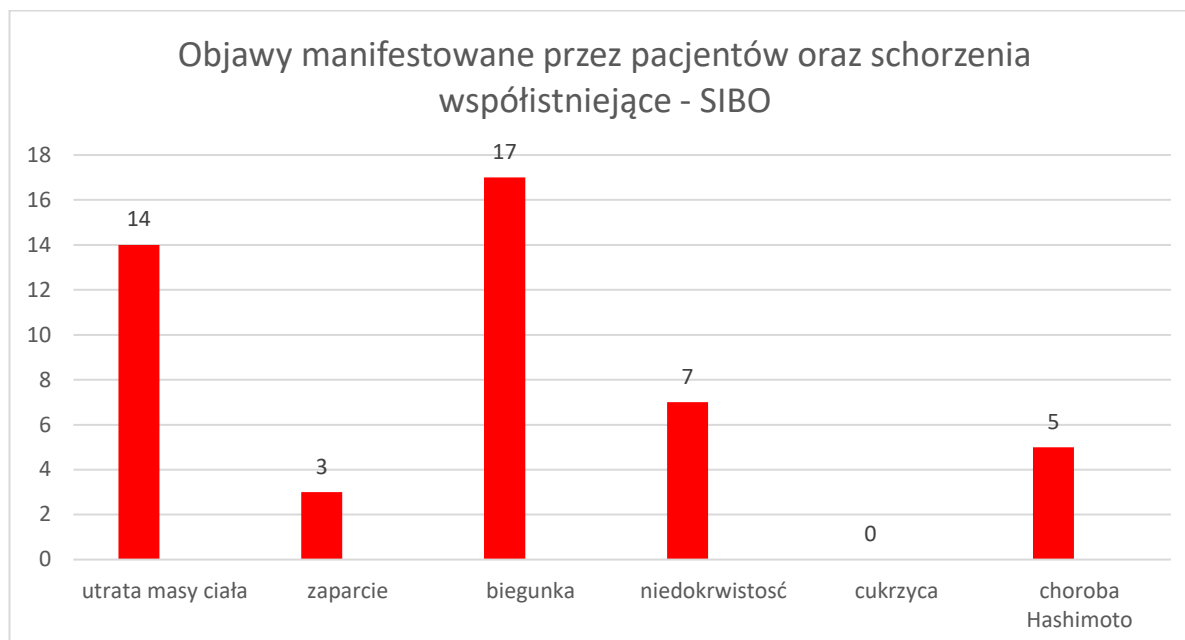


Wykres.2 Objawy manifestowane przez pacjentów z celiakią oraz schorzenia współistniejące. Liczba pacjentów n=28

Wśród pacjentów ze współistniejącą cukrzycą 2 osoby prezentowały równocześnie niedokrwistość z niedoboru żelaza, a jedna osoba płci żeńskiej miała dodatkowo rozpoznaną chorobę Hashimoto, jednak bez objawów niedokrwistości niedoborowej. Osoby ze zdiagnozowaną chorobą Hashimoto nie manifestowały niedokrwistości, jedna osoba zaprezentowała znaczną utratę masy ciała (18 kg/18 miesięcy) z równoczesnym występowaniem zaparć. Zaburzenia rytmu wypróżnień i utrata masy ciała dotyczyła przede wszystkim osób bez zdiagnozowanych chorób współistniejących

- SIBO

Pacjenci z rozpoznaniem przerostem bakteryjnym jelita cienkiego zostali zakwalifikowani do grupy nazwanej zespół zaburzeń wchłaniania. Jako kryterium rozpoznania SIBO przyjęto dodatni wynik wodorowego testu oddechowego wykonanego po obciążeniu laktulozą. Test wykonano za pomocą Gastrolyzera; wynik dodatni oznaczał wzrost stężenia wodoru w wydychanym powietrzu o 12 ppm między 30 a 60 min testu od wartości na czczo. Wszyscy pacjenci mieli wykluczoną chorobę trzewną na podstawie gastroskopii oraz badań serologicznych – przeciwciała anty tTG/EMA – wynik ujemny. Średnie stężenie CRP wynosiło 3,17 mg/dl, stężenie hemoglobiny wyniosło 12,95 g/dl, średnie stężenie albumin w surowicy krwi wyniosło 4,67 g/dl zaś białka całkowitego 7,23 g/dl. Pacjenci z tej grupy prezentowali bardziej wyrażone objawy kliniczne manifestujące się jako utrata masy ciała w większości przypadków (14/31 – 45% pacjentów) oraz biegunki (17/31 – 54% osób)



Wykres 3. Objawy manifestowane przez pacjentów z SIBO oraz choroby współistniejące. Liczba chorych n=31

Pacjenci, którzy jednocześnie mieli zdiagnozowaną chorobę Hashimoto nie manifestowali niedokrwistości, 3 osoby z 5 skarżyły się na występowanie luźnych stolców. Osoby z biegunkami bez współistniejących schorzeń zgłaszały utratę masy ciała jako dominujący objaw. Żaden z pacjentów w tej grupie nie miał rozpoznanej cukrzycy.

- Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowili pacjenci hospitalizowani z przyczyn gastroenterologicznych u których wykluczono celiakię oraz SIBO. W grupie kontrolnej średnie stężenie CRP wynosiło 3,09 mg/dl, hemoglobina 13,58 g/dl, poziom albumin w surowicy krwi wynosił 4,56 g/dl a białka całkowitego 7,12 g/dl.



Wykres 4. Objawy prezentowane przez pacjentów z grupy kontrolnej oraz schorzenia współistniejące. Liczba chorych n=30

Wszyscy pacjenci z dodatkowo współistniejącą cukrzycą prezentowali utratę masy ciała oraz biegunki, 2 osoby z 3 manifestowało niedojrwość z niedoboru żelaza, a jedna osoba z 3 chorobę Hashimoto. Wśród pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy połowa z nich miała zdiagnozowaną niedokrwistość. Również w tej grupie przeważała biegunka.

4.2 Porównanie surowic pacjentów z celiakią i z grupy kontrolnej:

W modelu ClinProtModel - uzyskano 139 pików

Tabela 8. Wartości walidacji krzyżowej, walidacji zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych algorytmów (modeli)

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna – poprawność klasyfikacji widma [%]	
			celiakia	Grupa kontrolna
Genetic Algorithm	68	98	75	50
Supervised Neural Network	66	88	85	45
Quick Classifier	72	74	85	40

Wartości walidacji krzyżowej oraz zdolność rozpoznawania pokazują, który model (algorytm) jest najbardziej dokładny; im wyższe te wartości tym większe jest prawdopodobieństwo poprawności

klasyfikacji. W porównaniu profili peptydowych celiakii i pacjentów z grupa kontrolną najwyższe wartości uzyskał model QC (Quick Classifier)

4.2.1. Celiakia vs grupa kontrolna – model Genetic Algorithm - GA

Tabela 9. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value)

Masa [Da]	Test -T	Test Wilcoxona	Test Anderson – Darling
1677,53	0,0846	0,0778	0,125
1655,65	0,4410	0,3340	0,00284
3974,85	0,0993	0,1040	0,0594
1866,11	0,1430	0,1770	<0,000001
1532,37	0,1990	0,2510	0,00159
1441,20	0,1530	0,2010	0,0442
1207,45	0,5760	0,6790	0,0229
4350,57	0,0939	0,0666	0,00153
1457,67	0,2920	0,3260	0,0542
3364,02	0,0669	0,0411	0,0537
4093,23	0,0669	0,0603	0,0343
4646,93	0,0846	0,0778	0,00287
4713,8	0,0846	0,0681	0,003
1435,73	0,1660	0,1700	0,0555
<u>4055,63</u>	<u>0,0669</u>	<u>0,0411</u>	<u>0,00423</u>

Dla modelu Genetic Algorithm uzyskano istotność satytystyczną w teście Wilcoxona oraz Anderson - Darling dla piku o masie 4055,63. Nie wykazano istotności statystycznej w teście T – Studenta. Pozostałe piki nie uzyskały różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami

Do identyfikacji zakwalifikowano tylko peptydy o masie poniżej 3500 Da – wynika to z ograniczeń metodologicznych. Wartości powyżej 3500 Da nie były identyfikowane spektrometrem mas (zakres od 700 – 3500 Da)

Tabela 10. Piki różnicujące – identyfikacja peptydów

m/z [Da]	Identyfikacja
1457.67	-----
3954.15	-----
4055,63	-----
1532.37	-----
1655.65	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
1677.53	-----
8623.76	-----
1351.46	fibrinogen alpha chain
1866.11	
1897.17	-----
1564.17	-----
4196.36	-----
2770.32	-----
2682.4	-----
1526.62	fibrinogen alpha chain
7783.76	-----

Pogrubioną czcionką zaznaczono pik wykazujący istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami. Z tabeli wykreślono piki o m/z powyżej 3500 Da -z uwagi na rozdzielczość metody nie były one poddawane identyfikacji.

4.2.2 Celiakia vs grupa kontrolna - model Supervised Neural Network - SNN

Tabela 11. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value)

Masa [Da]	Test T	Test Wilcoxona	Test Anderson - Darling
1364,59	0,6780	0,6740	0,000608
1229,40	0,9340	0,9540	0,116
1677,53	0,0846	0,0778	0,125
1389,66	0,6780	0,6790	0,00359
1261,51	0,8820	0,9540	<0.000001
1419,68	0,1660	0,1800	0,00596
1866,11	0,1430	0,1770	<0.000001
1021,28	0,8820	0,9350	<0.000001
1277,49	0,7490	0,1700	<0.000001
<u>3192,87</u>	<u>0,0939</u>	<u>0,0257</u>	<u><0.000001</u>
1585,04	0,8570	0,3510	0,000383
2770,02	0,1430	0,0778	0,0000598
<u>3284,71</u>	<u>0,0669</u>	<u>0,0132</u>	<u><0.000001</u>
<u>3303,28</u>	<u>0,0774</u>	<u>0,0180</u>	<u><0.000001</u>
1441,20	0,1530	0,2010	0,0422
1526,62	0,1320	0,1410	0,0977
2554,45	0,0920	0,0666	<0.000001
4212,20	0,1010	0,1010	<0.000001
<u>2933,24</u>	<u>0,1160</u>	<u>0,0411</u>	<u><0.000001</u>
<u>3214,75</u>	<u>0,0537</u>	<u>0,0113</u>	<u>0,000109</u>
1532,37	0,1990	0,2510	0,0159
<u>4373,42</u>	<u>0,0794</u>	<u>0,0447</u>	<u>0,00159</u>

W modelu Supervised Neural Network uzyskano istotne statystycznie różnice w intensywności dla pików o masie (w Da): 3192,87, 3284,71, 3303,28, 2933,24, 3214,75 oraz 4373,42 w teście Wilcoxona oraz Anderson-Darling (wyłuszczone drukiem i podkreślone).

Tabela 12. Piki różnicujące – identyfikacja peptydów

m/z [Da]	Identyfikacja
1389.66	-----
1364.59	-----
1229.4	-----
1677.53	-----
1261.51	-----
1419.68	-----
1553.66	fibrinogen alpha chain
1021.28	fibrinogen alpha chain
1457.67	-----
1866.11	complement C3
1078.26	fibrinogen alpha chain
<u>3284.71</u>	-----
<u>3303.28</u>	-----
1585.04	-----
2554.45	fibrinogen alpha chain
1277.49	-----
<u>3192.87</u>	-----
<u>2933,24</u>	-----
1526.62	serum deprivation-response protein
<u>3214.75</u>	-----
<u>4373.42</u>	-----
1504.98	complement C3
2770.02	-----

Z tabeli wykreślono piki o m/z powyżej 3500 Da – nie były one poddawane identyfikacji; wynika to z rozdzielczości metody, zaś pogrubioną czcionką podkreślono peptydy wykazujące różnice w intensywności pomiędzy grupami.

4.2.3 Celiakia vs grupa kontrolna – model Quick Classifier

Tabela 13. Istotność statystyczna dla pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value)

Masa m/z [Da]	Test T	Test Wilcoxona	Test Anderson - Darling
<u>3214,75</u>	<u>0,0537</u>	<u>0,0113</u>	<u>0,000109</u>

Tabela 14 . Piki różnicujące – identyfikacja peptydów

m/z [Da]	identyfikacja
3214,75	-----

W przypadku modelu Quick Classifier uzyskano istotnie statystyczną różnicę w przypadku surowicy osób z celiakią a osób z grupy kontrolnej – białko różnicujące o masie cząsteczkowej 3214,75 (test Wilcoxona p value = 0,0113, test Anderson - Darling p value = 0,000109) oraz tendencji statystycznej wykazanej w teście T - Studenta (p - value na granicy istotności statystycznej = 0,0537). Ponadto algorytm Quick Classifier uzyskał najwyższe wartości procentowe dla walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania.

Dokonano także porównania wartości wyników badań laboratoryjnych. Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic w parametrach laboratoryjnych (poziom istotności $p < 0,05$)

Tabela 15. Porównanie parametrów laboratoryjnych – (wartości średnie) - między grupami celiakia/grupa kontrolna

	Celiakia	Kontrola	P – value
Albuminy	4,28 g/l	4,56 g/dl	0,102
Białko całkowite	6,86 g/l	7,12 g/dl	0,183
CRP	4,03 mg/dl	3,9 mg /dl	0,098
Hemoglobina	12,98 g/dl	13,58 g/dl	0,095

4.3 Porównanie surowic pacjentów z zespołem zaburzeń wchłaniania (SIBO) i z grupy kontrolnej.

W modelu ClinProtModel - uzyskano 132 piki

Tabela 16. Wartości walidacji krzyżowej, walidacji zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych algorytmów (modeli)

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna – poprawność klasyfikacji widma [%]	
			SIBO	Grupa kontrolna
Genetic Algorithm	49	92.08	86.7	40
Supervised Neural Network	58.77	80.31	86.7	30
Quick Classifier	52.46	68.31	46.7	30

Najwyższe wartości walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania uzyskano dla modelu Supervised Neural Network. Model ten warunkuje największą poprawność klasyfikacji w porównaniu grup SIBO/kontrola.

4.3.1 Porównanie SIBO vs grypa kontrolna – model Genetic Algorithm

Tabela 17. Istotność statystyczna pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value)

Masa w Da	Test T	Test Wilcoxon	Test Anders -Darling
9318,52	0.531	0.486	0.0334
1479,54	0.743	0.513	0.0122
1245,45	0.743	0.955	0.0378
1207,45	0.531	0.491	0.031
1277,48	0.442	0.397	0.00000633
1304,75	0.442	0.397	0.317
4647,16	0.566	0.551	0.085
9377,58	0.562	0.525	0.0219
9357,73	0.531	0.486	0.0334
2769,95	0.734	0.486	< 0.000001
3954,27	0.531	0.486	< 0.000001
1519,73	0.531	0.506	0.0421
1866,12	0.786	0.851	< 0.000001
3192,87	0.62	0.507	< 0.000001
1389,69	0.734	0.875	0.000493

Dla algorytmu Genetic Algorithm nie wykazano różnic istotnych statystycznie w intensywności dla żadnego z pików.

Tabela 18. Piki różnicujące wraz identyfikacją.

m/z [Da]	Identyfikacja
9318.52	-----
1479.54	-----
1245.45	-----
1207.45	mucin 3A
1277.48	-----
1304.75	-----
4647.16	-----
9377.58	-----
9357.73	-----
2769.95	fibrinogen alpha chain
3954.27	-----
1519.73	complement C3 (oxidation)
1866.12	complement C3
3192.87	-----
1389.69	-----

Do identyfikacji zakwalifikowano tylko peptydy o masie poniżej 3500 Da – wynika to z ograniczeń metodologicznych. Wartości powyżej 3500 Da nie były identyfikowane spektrometrem mas (zakres od 700 – 3500 Da)

4.3.2 Porównanie SIBO vs grupa kontrolna – model Supervised Neural Network

Tabela 19. Wartości p- value w poszczególnych testach statystycznych – piki zakwalifikowane do klasyfikacji

Masa [Da]	Test T	Test Wilcoxona	Test Anderson - Darling
1261,52	0.391	0.397	< 0.000001
1389,69	0,734	0,875	0,000493
1441,18	0.598	0.506	0.0105
1245,45	0,743	0,955	0,0378
1364,56	0,977	0,525	0,000471
1866,12	0,786	0,851	< 0.000001
1078,26	0,763	0,939	< 0.000001
1021,26	0,821	0,742	< 0.000001
1479,54	0,743	0,513	0,0122
1435,71	0,745	0,7	0,0679
1457,65	0,814	0,7	0,0165
2933,23	0,734	0,542	< 0.000001
1229,39	0,665	0,75	0,00386
3192,87	0,62	0,507	< 0.000001
1207,45	0.531	0.491	0.031
5952,03	0,531	0,418	< 0.000001
4242,19	0.562	0,506	< 0.000001
3284,67	0.442	0.397	< 0.000001
3303,29	0,531	0,397	< 0.000001
4251,43	0.442	0.397	0.00125
1504,99	0.566	0.486	0.293
1655,66	0,745	0,978	< 0.000001

Dla modelu Supervised Neural Network również nie uzyskano różnic istotnych statystycznie we wszystkich testach. Algorytm ten cechuje się najwyższymi wartościami dla walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania.

Tabela 20. Piki różnicujące oraz identyfikacja

m/z [Da]	Identyfikacja
1261.52	-----
1389.69	-----
1441.18	-----
1245.45	-----
1364.56	-----
1866.12	complement C3
1078.26	fibrinogen alpha chain
1021.26	fibrinogen alpha chain
1479.54	-----
1435.71	complement C4A
1457.65	-----
2933.23	-----
1229.39	-----
3192.87	-----
1207.45	mucin 3A
5952.03	-----
4212.19	-----
3284.67	-----
3303.29	-----
4251.43	-----
1504.99	-----
1504.99	complement C3
1655.66	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4

Podobnie jak w poprzednich modelach do identyfikacji zakwalifikowano tylko peptydy o masie poniżej 3500 Da – wynika to z ograniczeń metodologicznych. Wartości powyżej 3500 Da nie były identyfikowane spektrometrem mas (zakres od 700 – 3500 Da)

4.3.3 Porównanie SIBO vs grupa kontrolna – model Quick Classifier

Tabela 21. Istotność statystyczna pików zakwalifikowanych do klasyfikacji (p-value)

Masa [Da]	Test -T	Test Wilcoxona	Test anderson–Darling
1261.52	0,391	0,397	<0,00001
1277.48	0,442	0,397	0,00000633
1283.27	0,318	0,397	0,0000018
1299.4	0,318	0,397	0,00127
1304.75	0,442	0,397	0,317
1466.65	0,442	0,397	0,0342
1568.57	0,531	0,397	<0,00001
1584.96	0,562	0,397	0,0000113
1660.99	0,562	0,397	<0,00001
2682.41	0,525	0,397	0,00713
2793.65	0,566	0,397	<0,00001
2993.41	0,531	0,397	0,129
3214.85	0,442	0,397	0,00013
3232.42	0,562	0,397	<0,00001

Dla modelu Quick Classifier również nie uzyskano różnic istotnych statystycznie.

Tabela 22. Piki różnicujące oraz identyfikacja

m/z [Da]	Identyfikacja
1261.52	-----
1277.48	-----
1283.27	-----
1299.4	-----
1304.75	-----
1466.65	fibrinogen alpha chain
1568.57	kininogen-1
1584.96	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
1660.99	-----
2682.41	-----
2793.65	-----
2993.41	-----
3214.85	-----
3232.42	-----

W tej grupie również porównano wybrane wartości parametrów laboratoryjnych surowic pacjentów z SIBO oraz z grupy kontrolnej. Nie uzyskano różnic istotnych statystycznie.

Tabela 23. Porównanie wartości parametrów laboratoryjnych – SIBO/grupa kontrolna (wartości średnie)

	SIBO	Kontrola	P-value
Albuminy	4,67 g/dl	4,56 g/dl	0,303
Białko całkowite	7,23 g/dl	7,12 g/dl	0,308
CRP	3,17 mg/dl	3,9 mg/dl	0,519
Hemoglobina	12,95 g/dl	13,58 g/dl	0,941

4.4 Porównanie surowicy pacjentów z rozpoznaną celiakią i SIBO (zespół zaburzeń wchłaniania)

Uzyskano 137 pików

Tabela 24. Wartości walidacji krzyżowej, zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania dla poszczególnych modeli.

Model	Walidacja krzyżowa [%]	Zdolność rozpoznawania [%]	Walidacja zewnętrzna – poprawność klasyfikacji widma [%]	
			Celiakia	ZZW (SIBO)
Genetic Algorithm	52.92	88.15	71.4	53.3
Supervised Neural Network	58.69	74.15	95.2	13.3
Quick Classifier	35.15	64.23	14.3	93.3

Najwyższe wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania uzyskał model Supervised Neural Network, a więc gwarantuje największą poprawność w klasyfikacji.

4.4.1 Porównanie celiakia vs ZZW (SIBO) - Genetic Algorithm

Tabela 25. Istotność statystyczna – p- value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.

Masa w [Da]	Test T	Test Wilcoxona	Test Anders – Darling
1419,67	0,598	0,676	0,0137
6642,18	0,417	0,44	0,00579
1655,68	0,467	0,44	<0,000001
3303,3	0,417	0,44	0,00074
3263,97	0,417	0,44	<0,000001
1537,76	0,568	0,763	<0,000001
3192,95	0,417	0,44	<0,000001
2022,25	0,463	0,44	0,0048
1373,43	0,417	0,44	0,011
1264,02	0,417	0,44	0,000351
4271,53	0,605	0,644	0,037
1299,43	0,417	0,44	<0,000001
4093,36	0,417	0,44	0,00453
1441,16	0,632	0,727	0,00808
4127,17	0,417	0,44	0,00984

W modelu Genetic Algorithm nie uzyskano istotności statystycznej dla żadnego z pików.

Tabela 26. Piki różnicujące oraz identyfikacja

m/z {Da}	Identyfikacja
1419.67	-----
6642.18	-----
1655.68	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
3303.3	-----
3263.97	-----
1537.76	-----
3192.95	-----
2022.25	complement C3
1373.43	-----
1264.02	-----
4271.53	-----
1233.43	-----
4093.36	-----
1441.16	-----
4127.17	-----

Podobnie jak w poprzednich modelach do identyfikacji zakwalifikowano tylko peptydy o masie poniżej 3500 Da – wynika to z ograniczeń metodologicznych. Wartości powyżej 3500 Da nie były identyfikowane spektrometrem mas (zakres od 700 – 3500 Da)

4.4.2 Model Supervised Neural Network – porównanie celiakia vs ZZW

Tabela 27. Istotność statystyczna – p- value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.

Masa – w Da	Test -T	Test Wilcoxona	Test Anderson – Darling
1897,2	0,925	0,44	<0,000001
1568,6	0,467	0,44	<0,000001
1261,56	0,417	0,44	<0,000001
1655,68	0,417	0,44	0,000001
1564,21	0,417	0,44	<0,000001
1419,67	0,598	0,676	0,0137
1526,62	0,417	0,44	0,25
1505,03	0,529	0,558	0,375
3263,97	0,417	0,44	<0,000001
1078,25	0,568	0,798	0,000001
1677,57	0,486	0,727	0,0000169
1021,27	0,664	0,581	<0,000001
2554,46	0,417	0,44	<0,000001
4413,08	0,417	0,44	<0,000001
4374,39	0,417	0,44	<0,000001
2933,24	0,417	0,44	<0,000001
1585,14	0,568	0,476	<0,000001
1264,02	0,417	0,44	0,000351
3954,55	0,616	0,54	0,0685

Algorytm ten ma najwyższą wartość walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania. Wykazano istotnie statystycznie różnice dla wybranych pików tylko w teście Anderson – Darling

Tabela 28. Piki różnicujące i identyfikacja

m/z [Da]	Identyfikacja
1897.2	-----
1568.6	kininogen-1
1261.56	-----
1655.68	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
1564.21	kininogen-1
1419.67	-----
1526.62	serum deprivation-response protein
1505.03	-----
3263.97	-----
1078.25	fibrinogen alpha chain
1677.57	-----
1021.27	fibrinogen alpha chain
2554.46	fibrinogen alpha chain
4413.08	-----
4374.39	-----
2933.24	-----
1585.14	-----
1264.02	-----
3954.55	-----

Do identyfikacji zakwalifikowano tylko peptydy o masie poniżej 3500 Da – wynika to z ograniczeń metodologicznych. Wartości powyżej 3500 Da nie były identyfikowane spektrometrem mas (zakres od 700 – 3500 Da)

4.4.3 Model Quick Classifier - porównanie celiakia vs ZZW

Tabela 29. Istotność statystyczna – p- value dla poszczególnych pików zakwalifikowanych do klasyfikacji.

Masa – w Da	Test t	Test Wilcoxona	Test Anders – Darling
1261,56	0,417	0,44	<0,000001
1264,02	0,417	0,44	0,000351
1283,29	0,417	0,44	<0,000001

Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w algorytmie Quick Classifier

Tabela 30. Piki różnicujące oraz identyfikacja

m/z [Da]	Identyfikacja
1261.56	-----
1264.02	-----
1283.29	-----

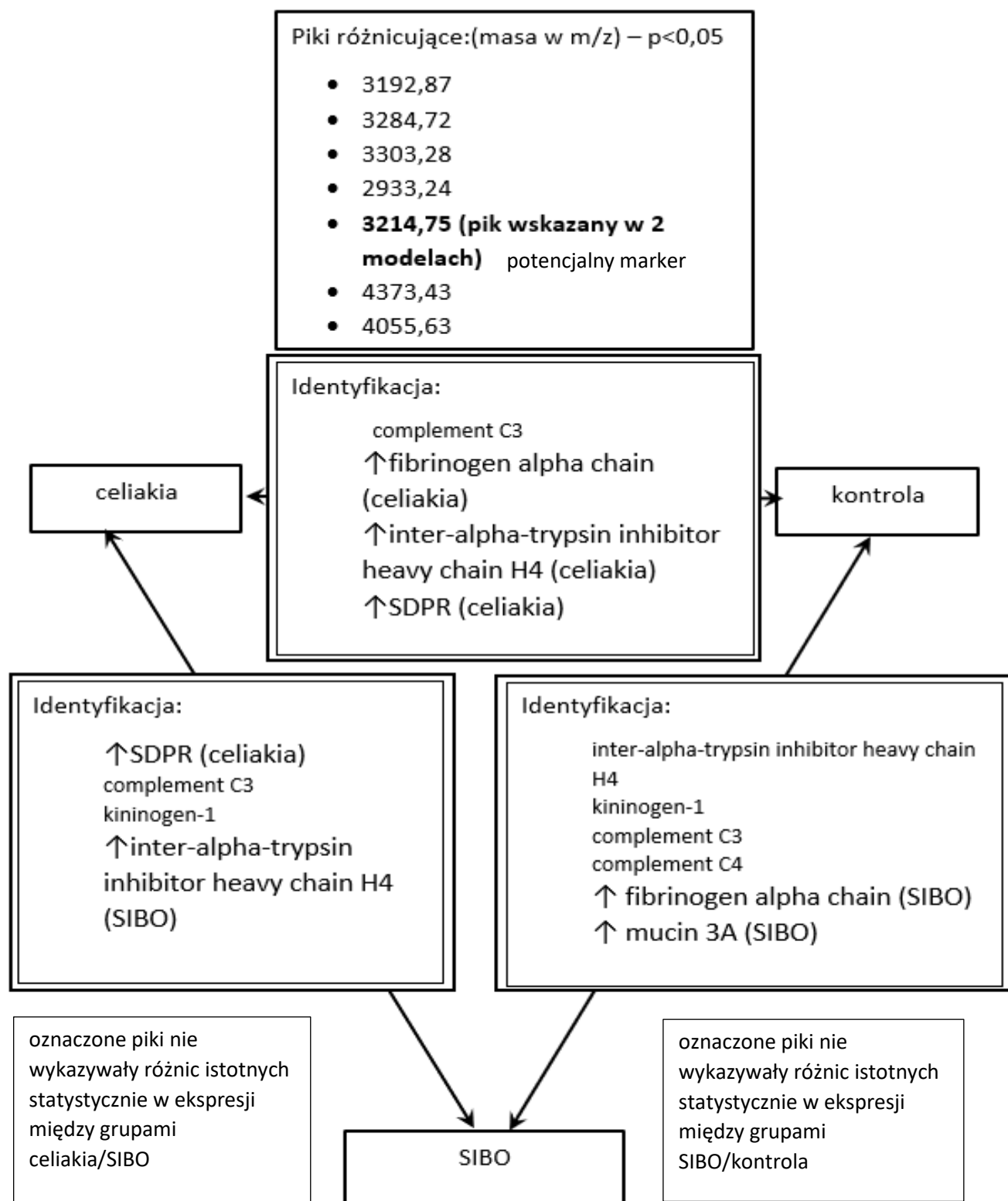
Aby uznać pik za istotny statystycznie musi zostać wykazana istotność statystyczna (p-value<0,05) w conajmniej 2 testach statystycznych [127]

Również dokonano porównania parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami

Tabela 31. Porównanie parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami – grupy SIBO/celiakia (wartości średnie)

	Celiakia	SIBO	P- value
<u>Albuminy</u>	<u>4,28 g/dl</u>	<u>4,67g/dl</u>	<u>0,030</u>
Białko (śr)	6,86 g/dl	7,23 g/dl	0,062
CRP	4,03 mg/dl	3,17 mg/dl	0,053
Hemoglobina	12,98 g/dl	12,95 g/dl	0,943

Uzyskano istotnie statystyczną różnicę w stężeniu albumin w surowicy krwi pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem SIBO oraz celiakią ($p = 0,03$). Pacjenci z rozpoznaną celiakią w momencie włączenia do badania mieli już postawione rozpoznanie i przestrzegali diety bezglutenowej; prezentowali mniej wyrażone objawy kliniczne. Wśród pacjentów zakwalifikowanych do grupy SIBO w momencie rekrutacji do badania 54% chorych prezentowało biegunki (jako definicję biegunki przyjęto powyżej 3 stolców/dobę o zmienionej konsystencji) oraz utatę masy ciała – 45% osób. W przypadku celiakii odpowiednio 17% i 21%. Przypuszczalnie istnieją jeszcze inne czynniki mające wpływ na odbudowę kosmków jelitowych. Istotny jest też ponad 5 letni czas trwania choroby, który niesie ze sobą implikacje metaboliczne, stąd niższy poziom albumin w surowicy krwi. Ponadto zwraca uwagę p - value 0,053 (na granicy istotności statystycznej) w porównaniu parametru CRP pomiędzy grupami, stąd wniosek, że CRP może mieć znaczenie (prawdopodobny stan zapalny).



Ryc. 1. Graficzne przedstawienie wyników.

Porównanie surowic 3 grup pacjentów: celiakia/kontrola, SIBO/kontrola oraz celiakia/SIBO. Zarówno w przypadku celiakii jak i SIBO można zaobserwować nieznaczny wzrost ekspresji fibrynogenu.

SDPR - serum deprivation-response protein, SIBO – small intestinal bacterial overgrowth

5.1. Dyskusja

Kompletną sekwencję genomu człowieka opublikowano w 2001, stąd kolejnym etapem niezwykle istotnym dla badaczy stało się opracowanie listy białek występujących w organizmie ludzkim, które ogólnie określono mianem proteomu. Nazwa proteom wywodzi się z angielskiego wyrażenia **PROTE***in*expressed *by the gen***OME** i jest to zbiór wszystkich białek kodowanych przez genom, wytwarzanych przez komórkę czy tkankę. Badania proteomiczne koordynowane są przez powołaną w 2001 Organizację Proteomu Ludzkiego (HUPO), same badania zaś bazują na metodach rozdzielania białek oraz bioinformatyce połączonej z badaniami spektrometrycznymi. [129] Bioinformatyka proteomiczna jest narzędziem wykorzystywanym w badaniach proteomicznych; pozwala na opracowanie konkretnych programów i algorytmów, które w znacznym stopniu ułatwiają analizę wyników eksperymentu. Najczęściej w badaniach proteomicznych porównuje się profile peptydowe grup pacjentów – zdiagnozowanych oraz grupy kontrolnej. Analizy dokonuje się z zastosowaniem algorytmów bioinformatycznych celem uzyskania najbardziej reprezentatywnych wyników. Proteomika kliniczna jest to dział nauki, której istotą jest poszukiwanie istotnych różnic w profilach peptydowych osób zdrowych i chorych. [130]

Obecnie wysoko zaawansowane metody takie jak proteomika czy genomika mogą dostarczyć wielu cennych informacji dotyczących chorób zwracających szczególną uwagę klinicystów. Metody te mogą pozwolić zrozumieć molekularne mechanizmy prowadzące do zachorowania na celiakię. W swoim badaniu Tavirani M.R i współpracownicy przeprowadzili badanie polegające na analizie profilu RNA pacjentów z rozpoznaną chorobą trzewną. Wykazano związek z receptorem CXCR1, gdzie w przypadku pacjentów z celiakią jest wyższa ekspresja genu kodującego to białko. Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy genami kodującymi NFKB1, IL6 oraz TP53 a zachorowaniem na celiakię; ponadto gen TP53 i jego produkt są dobrze znane jako inicjator stanu zapalnego czy powiązań z genezą wielu rodzajów nowotworów. [131]

W ostatnich latach proteomika kliniczna bardzo się rozwija, analizy osocza czy innych płynów ustrojowych generują wzorce pików o masie oscylującej między 1 a 20 kDa odpowiedzialne za dyskryminację odpowiednio osób zdrowych oraz z różnymi jednostkami chorobowymi np. rak prostaty, piersi czy inne. Dalsze badania identyfikujące piki różnicujące wykazały, że oznaczone biomarkery są fragmentami mniejszych lub większych białek obecnych w surowicy. Wiele markerów specyficznych dla danych jednostek chorobowych jest identyfikowanych za pomocą metod immunoenzymatycznych bądź fluorescencji. Sparbier K. i wsp. wykazali, że w porównaniu do metody ELISA metoda badawcza wykorzystująca spektrometrię MALDI – TOF jest bardziej czuła. Metoda ta pozwala analizować peptydy i białka z dużą dokładnością jeśli chodzi o masę cząsteczkową. [132]

Z uwagi na fakt, że zespół zaburzeń wchłaniania jest zespołem o różnorodnym obrazie klinicznym, diagnostyka stanowi pewne trudności. Objawy najczęściej są niespecyficzne, mogą występować w różnych jednostkach chorobowych, co może wiązać się z błędnym rozpoznaniem. Najczęściej występującym objawem jest przewlekła biegunka, która występuje również w przypadku innych schorzeń, co może opóźniać leczenie i rozpoznanie. Dlatego do diagnostyki przyczyn zespołu zaburzeń wchłaniania wykorzystuje się szczegółowe badania stolca, endoskopię czy badania krwi. Zaburzenia wchłaniania najczęściej mają charakter wrodzony lub nabyty i mogą być globalne lub dotyczyć tylko jednego składnika odżywczego. Zazwyczaj dochodzi do zaburzeń przełonowego transportu składników odżywczych przez błony komórek nabłonka jelitowego [133]

Choroba trzewna stanowi istotny problem diagnostyczny, należy do przewlekłych zaburzeń jelita cienkiego, gdzie u predysponowanych genetycznie osób dochodzi do atrofii kosmków jelitowych po ekspozycji na gluten; dotyczy to około 1% populacji. [134] Różne manifestacje kliniczne choroby powodują, że 6 na 7 pacjentów nie zostaje zdiagnozowanych. Ta dysproporcja wskazuje na częste występowanie postaci niemej klinicznie bez klasycznych objawów gastroenterologicznych takich jak biegunka czy niedożywienie. Objawy pozagastroenterologiczne są niespecyficzne i zazwyczaj jest to niedokrwistość, osteoporoza czy zaburzenia funkcji tarczycy. Postawienie rozpoznania jest kluczową kwestią; nieleczone i niezdiagnozowane choroby trzewne prowadzi do wystąpienia wielu powikłań ogólnoustrojowych takich jak niepłodność, osteoporoza, zbędne zabiegi chirurgiczne czy w końcu kancerogeneza. Tylko rygorystyczne przestrzeganie diety bezglutenowej może zapobiec powikłaniom. [135]

Diagnostyka opiera się na badaniach serologicznych, czyli przeciwciał antyendomizjalnych (EMA) oraz przeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej. [136]. Nadal wyzwaniem diagnostycznym jest obecność atrofii kosmków z negatywnymi wynikami serologicznymi. Ponieważ jest mało danych literaturowych odnośnie seronegatywnej postaci celiakii, nie jest do końca jasne, czy występują różnice kliniczne pomiędzy seropozytywną i seronegatywną postacią choroby trzewnej. Konieczne jest zatem zdefiniowanie jaka jest częstość występowania celiakii seronegatywnej wśród chorób przebiegających z zanikiem kosmków jelitowych. [137] Choroba trzewna stanowi około 79 do 93% przypadków zaniku kosmków jelitowych, w tym wariant seronegatywny. Inne przyczyny zaniku kosmków do różnicowania z celiakią to enteropatia polekowa, złożony nabyty niedobór odporności (CVID), choroba Leśniowskiego – Crohna, HIV oraz chłoniaki. Istnieje także wariant choroby trzewnej z dodatnim mianem przeciwciał oraz ujemnym badaniem genetycznym. Wspólnym postępowaniem dla wszystkich enteropatii będzie zatem szczegółowe przeprowadzenie wywiadu oraz endoskopia. [138]

Opóźnienie diagnostyki oraz brak postawienia rozpoznania nadal jest częstym problemem w praktyce klinicznej. Pomimo dostępnych narzędzi diagnostycznych obserwuje się powikłania takie jak choroby nowotworowe m.in. adenocarcinoma czy chłoniaki. Do wystąpienia chłoniaka predysponuje celiakia

dietooporna typ 2 (RCD2) – 50% pacjentów manifestuje objawy w późnym stopniu zaawansowania i najczęściej wymagają procedur chirurgicznych. Wczesne rozpoznanie choroby trzewnej pozwoliłoby uniknąć wystąpienia powikłań. W celu wykonania dokładnej diagnostyki można wykorzystywać endoskopię kapsułkową, jednak metoda ta jest bardziej dedykowana pacjentom z chorobą Leśniowskiego – Crohna. Zastosowanie badań radiologicznych, w tym rezonansu magnetycznego pozwala uwidocznienie powikłania choroby trzewnej, nie ma jednak możliwości różnicowania celiakii oraz celiakii dietoopornej typ 1 (RCD1), natomiast idealnie sprawdza się do oceny występowania chłoniaka.[139]

Dyspepsja czynnościowa jest jednym z częstszych zaburzeń gastroenterologicznych. Występuje u około 20% populacji i wpływa negatywnie na jakość życia. Sugeruje się związek pomiędzy występowaniem SIBO a dyspepsją czynnościową. Pacjenci najczęściej manifestują objawy zespołu zaburzeń wchłaniania, a więc biegunki, niedożywienie czy wzdęcia. Złotym standardem w diagnostyce SIBO jest pobranie aspiratu z proksymalnej części jelita cienkiego, czego najczęściej nie wykonuje się ze względu na inwazyjność. Wodorowe testy oddechowe jako nieinwazyjne narzędzie obarczone są możliwością wystąpienia wyniku fałszywie negatywnego. [140] Dodatkowo 15% populacji posiada florę bakteryjną nie produkującą wodoru, co może utrudniać diagnostykę. Ponadto około 56% pacjentów z dyspepsją czynnościową prezentuje objawy SIBO. Zaburzenie to może powodować niedobory witaminy B12, hipoalbuminemię czy wzrost markerów zapalnych [141] Brak wczesnego rozpoznania może prowadzić do wystąpienia zespołu jelita drażliwego (IBS), niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD), zapalnych chorób jelit czy ostrego zapalenia trzustki. SIBO jest przyczyną gorszego przebiegu ostrego zapalenia trzustki oraz wystąpienia niewydolności wielonarządowej. W przypadku współistnienia SIBO i ostrego zapalenia trzustki znacznie wzrasta śmiertelność – z 23 do 85% Szybkie rozpoznanie może zapobiec powikłaniom.[142].

Dane literaturowe pokazują, że badania proteomiczne mają zastosowanie w diagnostyce różnych jednostek chorobowych. Li Zhang i wsp. dokonali analizy proteomicznej surowicy pacjentów z zaburzeniami w obrębie tętnic wieńcowych w przebiegu choroby Kawasaki. Wykorzystano metodę identyfikacji przy pomocy spektrometru MALDI – TOF. Zidentyfikowano 38 dyskryminujących peptydów. Następnie trzy z nich –SHGB, LRG1 i TF zostały poddane walidacji poprzez analizę western blot. Zidentyfikowano także takie białka jak inhibitor inter alfa trypsyny (ITI), kininogen 1 (KNG 1), SERPINC1 (antytrambina III) oraz SERPINA1 (alpha-1-antytrypsin) Ostatecznie wszystkie peptydy zostały poddane obróbce bioinformatycznej. Główne funkcje wykrytych peptydów to aktywacja kaskady dopełniacza, modulacja odpowiedzi zapalnej czy odporności humoralnej. Białko LRG1 (leucine-rich alpha-2-glycoprotein) odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej w przypadku infekcji, inhibitor inter alfa trypsyny jest białkiem ostrej fazy. SERPINA1 należy do inhibitorów enzymów neutrofilii. Wzrost aktywności LRG1

ITI oraz zmniejszenie aktywności jednostki C3 dopełniacza może sugerować rolę odpowiedzi zapalnej w przebiegu infekcji patogenezę choroby Kawasaki. [143]

Inna analiza proteomiczna została przeprowadzona przez Aili He i wsp. i dotyczyła pacjentów chorujących na szpiczaka mnogiego. W badaniu porównano surowice 48 pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim oraz 74 pacjentów z grupy kontrolnej. Do porównań wykorzystano spektrometr MALDI – TOF oraz oprogramowanie bioinformatyczne CLINPROT system. Uzyskane widma analizowano statystycznie przy pomocy testu Welsha oraz dokonano analizy przy pomocy algorytmu SNN (Supervised Neural Network). Uzyskano 49 pików z istotnością statystyczną $p < 0,0001$, z tego zaś najbardziej dyskryminujące okazały się piki 2900,4, 3315,96, 7763,24 oraz 2660,65. Dlatego badania proteomiczne mogą okazać się istotnym i pomocnym narzędziem diagnostycznym. [144]

Na potrzeby powstawania niniejszego opracowania przeszukano dostępne bazy danych, między innymi bazę Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wprowadzono w wyszukiwarkę hasło „proteomic analysis in celiac disease” uzyskując 4443 rekordy, z czego większość dotyczyła wykorzystania badań proteomicznych w przemyśle spożywczym. W podobny sposób przeszukano bazę PubMed i uzyskano około 1380 rekordów, gdzie prace również dotyczyły przemysłu spożywczego. Rozszerzając zakres poszukiwań poprzez wpisanie hasła „proteomic analysis” uzyskano opracowania dotyczące wykorzystania tej metody badawczej głównie w dziedzinie onkologii. Liczba opracowań dotyczących bezpośrednio tematu badań proteomicznych w celiakii czy ogólnie w zespole zaburzeń wchłaniania jest niska, mało jest dostępnych badań. W przypadku choroby trzewnej wyszukano tylko kilka prac, natomiast nie ma w przeglądzie literaturowym opracowań dotyczących bezpośrednio SIBO. Wpisując w wyszukiwarkę wymienionych powyżej baz danych hasło „proteomic analysis in small intestinal bacterial overgrowth” lub „proteomic analysis in SIBO” uzyskano rekordy odnoszące się do definicji badań proteomicznych lub definicji i leczenia SIBO.

Bromilow S. i wsp. wykorzystali metody analiz proteomicznych do stworzenia bazy danych peptydów glutenowych różnych gatunków zbóż. Do projektu wybrano heksaploidalne odmiany pszenicy, gdyż są one reprezentatywne dla toksycznych peptydów gliadynowych kodowanych przez genomy A i B zarówno dla odmian heksaploidalnych gatunków, jak i tetraploidalnej pszenicy durum, podczas gdy peptydy kodowane przez genom D są silnymi wyzwalaczami choroby trzewnej. Peptydy glutenowe wyekstrahowano z ziaren pszenicy i po odpowiednim przygotowaniu poddano analizie spektrometrycznej. Następnie w oparciu o uzyskane wyniki zaczęto konstruować bazę danych zawierającą sekwencje aminokwasowe gliadyn. W ten sposób można wykorzystać powyższą metodę do kontrolowania zawartości gliadyn i innych toksycznych peptydów gliadynowych w żywności bezglutenowej.[88]

Również Dostalek P. i wsp. wykorzystali metody analiz proteomicznych do wykrywania obecności glutenu w syropie glukozowym. Dziesięć próbek syropu glukozowego (część wyprodukowanego na bazie pszenicy,

a część na bazie kukurydzy) poddano analizie MALDI –TOF nie wykazując obecności glutenu w próbkach. [145].

W etiopatogenezie celiakii biorą udział cząsteczki kompleksu HLA poprzez prezentację peptydów glutenu limfocytom T CD4+. W zależności od wariantu kompleksu HLA, czy jest to łańcuch α , β , DQ2.5, DQ2.2 czy DQ7.5 wykazuje się różne ryzyko wystąpienia choroby. Wykazano, że limfocyty T pacjentów posiadających wariant DQ2.5 lub DQ2.2 rozpoznają odmienne zestawy epitopów glutenu, co może sugerować, że te dwa warianty wybierają inne epitopy do prezentacji. Wykorzystując techniki proteomiczne Ergseng E. i wsp dokonali porównania endogennych autopeptydów związanych z kompleksem HLA DQ linii komórkowych limfoblastoidalnych B. Dokonano analizy spektrometrycznej identyfikując 12712 endogennych peptydów. Grupowanie danych ilościowych wykazało znaczne różnice w rodzajach peptydów między trzema wariantami cząsteczek DQ. W przypadku kompleksu DQ2.2 i DQ2.5 wykazano istotną różnicę w peptydach wiążących, a pozycja P3 była główną kotwicą preferującą treoninę i serynę. Limfocyty T pacjentów z celiakią DQ2.2 zawierają serynę w pozycji P3. Badanie to dostarczyło wielu nowych informacji pozwalających dokładniej zrozumieć związek choroby z HLA.[146]

W piśmiennictwie podejmowane są próby utworzenia sieci interakcji białko-białko (Protein-Protein Interaction Network) w chorobie trzewnej. Azodi M.Z. i wsp dokonali przeglądu literatury dotyczącej danych proteomicznych w celiakii. Zgodnie z badaniami ekspresji genów w wymienionych artykułach wyselekcjonowano 31 białek do badania. Sieci pokrewnych białek o różnej ekspresji zbadano metodami analiz PPI (protein-protein interaction). Wskazano ubikwitynę C, białko HSP 90 alfa, HSP 70 i proteinę 5 (proteinę regulującą glukozę), dodatkowo tak zwane białka opiekuńcze takie jak TCP1. Białka te według badaczy mogą być potencjalnym biomarkerem diagnostycznym. [147]

Badania nad białkami w chorobie trzewnej są niezwykle istotne, wykazano specyficzne białka towarzyszące anormalnym limfocytom T u pacjentów z celiakią dietooporną. Chorzy prezentowali hiperekspresję IgM, apolipoproteiny CIII oraz białek kompleksu Charcot – Leiden. Autorzy badania sugerują udział apolipoproteiny CIII w proliferacji anormalnych limfocytów T oraz transformacji w chłoniaka. Dodatkowo istnieje hipoteza, że zastosowanie alemtuzumabu może być pomocne w kontrolowaniu choroby.[148]

W niniejszym opracowaniu dokonano analizy proteomicznej trzech grup pacjentów: z rozpoznaną chorobą trzewną, z zespołem zaburzeń wchłaniania – w tym przypadku jest to obecność SIBO (przerost bakteryjny jelita cienkiego – small intestinal bacterial overgrowth) oraz grupy kontrolnej. Porównano profile peptydowe pacjentów z celiakią i grupę kontrolną, pacjentów z SIBO i grupą kontrolną oraz pacjentów z celiakią i z SIBO. W metodyce odniesiono się do struktury grup, bowiem grupy te nie przedstawiają

rozkładu normalnego populacji – znaczna przewaga kobiet. Dla każdej porównywanej grupy przeprowadzono analizę za pomocą trzech algorytmów (Genetic Algorithm, Supervised Neural Network oraz Quick Classifier) oraz w programie ClinProTool 3.0 (Bruker) wyliczono wartość p-value dla otrzymanych pików. Ponadto dla każdego wykorzystanego modelu wyliczono walidację krzyżową – wartość wskazującą na największą powtarzalność i poprawność klasyfikacji dla danej analizy.

Porównując profile peptydowe pacjentów z celiakią oraz grupą kontrolną najwyższe wartości walidacji krzyżowej uzyskano dla modelu Quick Classifier. W modelu tym uzyskano pik o masie 3214,75 Da. W grupie pacjentów z chorobą trzewną uzyskano o około 53% niższą ekspresję tego peptydu w stosunku do grupy kontrolnej. W dwóch testach uzyskano istotność statystyczną $p < 0,05$ (test Wilcoxon $p = 0,0113$ oraz test Anderson Darling $p = 0,000109$) natomiast co istotne w teście T - Studenta wartość p wyniosła 0,0537. Niektóre opracowania podają, że taka wartość p $0,05 < p < 0,1$ jest tendencją statystyczną i wpływ na wynik może mieć między innymi liczebność grupy [149], która tutaj wynosi 28 pacjentów z chorobą trzewną oraz 30 z grupy kontrolnej. Średnie poziomy albumin w surowicy krwi u pacjentów z celiakią oraz u pacjentów z grupy kontrolnej wynosiły odpowiednio 4,28 g/dl oraz 4,56 – nie wykazano istotności statystycznej ($p = 0,102$). Również nie uzyskano istotności statystycznej w zakresie poziomu białek w surowicy; w przypadku celiakii średnia dla grupy wynosiła 6,86, a dla osób z grupy kontrolnej wynosiła 7,12 ($p = 0,183$). Najprawdopodobniej brak istotności statystycznej w poziomach białek/albumin wynika z faktu, że w momencie rekrutacji do badania ponad 50% osób już było na ścisłej diecie bezglutenowej (16/28 osób – Marsh 0 lub 1).

W modelu Quick Classifier nie zidentyfikowano pików, dokonano analizy w Bazach Metabolitów takich jak : www.hmdb.ca, smpdb.ca oraz kegg – nie znaleziono metabolitu odpowiadającego danemu m/z.

Inny model o nieco niższych wartościach dyskryminujących – Genetic Algorithm z wartościami procentowymi walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania - odpowiednio 68% i 98% wykazał istotność statystyczną w dwóch testach – test Wilcoxon ($p = 0,0411$) oraz test Anderson Darling ($p = 0,0042$) dla pików 4055,63. Również dla tego modelu wykazano niższą intensywność dla pików 4055,63 w przypadku celiakii. Z uwagi na fakt, że m/z omawianego pików przekraczał 3500 Da nie był on poddawany procesowi identyfikacji. W modelu Genetic Algorithm zidentyfikowano 4 białka inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, fibrinogen alpha chain, complement C3 oraz serum deprivation-response protein. Białko białka inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 wykazywało mniejszą intensywność pików w przypadku grupy kontrolnej, jednak te różnice nie były istotne statystycznie – w 2 testach nie uzyskano istotności statystycznej (test – T $p = 0,441$, test Wilcoxon $p = 0,334$), istotność wykazał tylko test Anderson –Darling ($p = 0,002$).

Inhibitory inter - alpha – trypsyny izolowane z surowicy krwi należą do białek z grupy serynowych inhibitorów proteaz. Cechują się posiadaniem jednego lekkiego łańcucha oraz pięciu homologicznych

łańcuchów ciężkich. Łańcuchy ciężkie najczęściej powiązane są z patofizjologią stanu zapalnego oraz procesów kancerogennych. Proteiny te są kowalencyjnie związane z kwasem hialuronowym – głównym elementem macierzy pozakomórkowej. Wiązanie kwasu hialuronowego i stabilność macierzy są silnie zależne od inhibitorów inter – alpha trypsyny, dysregulacja w zakresie tych inhibitorów może wpływać na procesy waskularyzacji i rozprzestrzeniania się nowotworów. W dwóch badaniach proteomicznych inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3/H4 jako jedne z białek zostało wykryte u chorych z rakiem wątrobowokomórkowym czy żołądka wskazując na potencjalną korelację pomiędzy tymi białkami a chorobą nowotworowymi układu pokarmowego – wzrost stężenia danego białka.[150] W niniejszym opracowaniu w przypadku pacjentów z celiakią wykazano niższą ekspresję inhibitora inter- alpha trypsyny łańcucha H4, co by sugerowało, że nie ma związku z rakiem jelita grubego. Dane literaturowe również nie potwierdzają takiego ryzyka – Lebowohl i wsp. prowadzili badania polegające na porównaniu częstości występowania gruczolakoraków jelita grubego u pacjentów z rozpoznaną chorobą trzewną oraz z grupą kontrolną. Do badania włączono 180 chorych z celiakią oraz 346 pacjentów z grupy kontrolnej. Częstość występowania gruczolakoraków wynosiła odpowiednio 13% i 17%,; nie wykazano istotności statystycznej ($p=0,20$). [151]

białka inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 należy do osoczowych glikoprotein o masie około 120 kDa i należy do białek ostrej fazy. U pacjentów z rozpoznany rakiem wątrobowokomórkowym obserwowano zmniejszenie ekspresji tego białka w stosunku do pacjentów z marskością wątroby. [152]

Pacjenci z chorobą trzewną wykazywali tendencję do wyższej intensywności piku 1351,46 – co w identyfikacji odpowiada fibrinogen alpha chain. Dowiedziono, że prekursor dla fibrynogenu alpha może być białkiem wiążącym i maskującym naturalne przeciwciała przeciwko transglutaminazie tkankowej. Co więcej – wiązanie przeciwciał z fibrynogenem wykazało silną zależność od epitopów. Prekursor alfa fibrynogenu jest składnikiem surowicy, który może działać maskująco na przeciwciała przeciw transglutaminazie tkankowej, a zatem białko to może łączyć różne antygeny dla autoreaktywnych immunoglobulin, dlatego istotny jest stosunek autoprzeciwciał do białek nie będącymi immunoglobulinami [153] Hipoteza ta może częściowo tłumaczyć występowanie celiakii seronegatywnej.

Również w patogenezie celiakii nie należy zapominać o białkach układu dopełniacza, które stanowią 35 różnych białek surowicy biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Dopełniacz stanowi główny mediator kaskady zapalnej. Sugeruje się, że czynnik B dopełniacza jest najbardziej istotny w patogenezie celiakii. W przypadku pacjentów z chorobą trzewną obserwowano obniżenie ekspresji czynników dopełniacza w surowicy – C3, C4 i czynnika B. [154] Nie zaobserwowano natomiast różnic w aktywacji kaskady dopełniacza w odpowiedzi na infekcję np. *Streptococcus pneumoniae*; porównywano populację pediatryczną – 22 dzieci z celiakią oraz 18 z grupy kontrolnej ($p=0,497$). [155]

Serum deprivation – response protein (białko surowicy hamujące odpowiedź) (SDPR) zwane także jako białko cavin 2 jest wysoce wyspecjalizowanym białkiem błony komórkowej niezbędnym do transukcji

sygnału. Białko to może być zaangażowane w supresję nowotworu lub onkogenezę w zależności od rodzaju nowotworu np. w przypadku raka piersi, wątroby, nerek czy prostaty; jest supresorem. SDPR należy do niezależnych od wapnia białek wiążących fosfolipidy [156,157] Badanie wykazało wyższą ekspresję białka u pacjentów z chorobą trzewną, jednak bez znamiennej istotności statystycznej (test Anderson – Darling $p=0,0977$, w pozostałych testach – $p >0,05$). Pacjenci z chorobą trzewną prezentują relatywnie wyższe ryzyko nowotworzenia; wiele nowotworów zostaje rozpoznanych już po ustaleniu diagnozy choroby trzewnej. Ryzyko to wzrasta również w przypadku niezdiagnozowanej choroby oraz w 3 i 4 dekadzie życia. [158]

Model Supervised Neural Network wykazał istotną statystycznie różnicę w intensywności dla pików : 3192,87, 3284,71, 3303,28, 2933,24, 3214,75 oraz 4373,42. Wszystkie piki wykazywały się mniejszą intensywnością w przypadku grupy z rozpoznaną celiakią. W identyfikacji wskazano podobne białka jak w modelu Genetic Algorithm. Dwa modele czyli Quick Classifier oraz Supervised Neural Network wykazały istotność satystyczną dla piku 3214,75 kDa.

Najwyższą wartość walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania w porównaniu profili peptydowych pacjentów z SIBO oraz z grupy kontrolnej uzyskano dla modelu Supervised Neural Network– odpowiednio 58,77% oraz 80,31%. W przypadku tego modelu nie uzyskano istotności statystycznej dla żadnego piku. Dokonano identyfikacji pików zakwalifikowanych do klasyfikacji. Zidentyfikowano białka częściowo wspólne dla poprzedniego porównania czyli celiakii i grupy kontrolnej a więc dopełniacz jednostka C3, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, fibrinogen alpha chain. Pozostałe to dopełniacz C4A oraz mucin 3A. Zaobserwowano wzrost ekspresji mucin 3A oraz fibrynogenu – łańcuch alfa. Ekspresja jednostki C4A była porównywalna.

Mucin 3A jest białkiem związanym z błoną komórkową nabłonka jelita; kodowana jest przez gen MUC3A na chromosomie 7q22. Składa się z dwóch domen powtórzeń tandemowych, jedna z 375 resztami aminokwasowymi, druga z 17 resztami aminokwasowymi oraz z części transbłonowej składającej się z 72 reszt aminokwasowych. Inna lokalizacja to dwunastnica, pęcherz moczowy, ucho środkowe. Zasadniczą funkcją mucyn jest ochrona i nawilżanie błon komórkowych, zapewnianie integralności połączeń międzykomórkowych co ma na celu ochronę przed substancjami toksycznymi czy obcymi patogenami. Dodatkowo mucyny pełnią funkcję receptorów reagujących na różne bodźce zewnętrzne dla różnych odpowiedzi komórkowych m.in różnicowanie, proliferacja czy apoptoza.[159] W momencie powstawania niniejszego opracowania nie dysponowano danymi literaturowymi odnośnie zależności ekspresji mucyny 3A w badaniach proteomicznych u pacjentów z SIBO. Jako że SIBO jest definiowane jako wzrost liczby niepatogennych bakterii w początkowym odcinku przewodu pokarmowego, a więc powyżej 10^5 CFU/ml treści jelitowej [160], a lokalizacja białka mucyna 3A to najczęściej początkowy odcinek jelita cienkiego; do funkcji należy między innymi zapewnienie integralności połączeń międzykomórkowych. [159] Można

wnioskować, że obecność SIBO przyczynia się do naruszenia tej integralności, stąd wiązałyby się zwiększona ekspresja omawianego białka. Brak jednak doniesień literaturowych mogących potwierdzić tą hipotezę.

Powszechnie wiadomo, że układ dopełniacza stanowi około 40 różnych białek oraz receptorów błonowych i jest znany z funkcji inicjowania oraz modulowania odpowiedzi immunologicznej w przebiegu różnych zakażeń. Aktywacja tego układu może być klasyczna, lektynowa, alternatywna oraz zewnętrzna. Jednostka C4A szczególnie posiada aktywność skierowaną przeciwko bakteriom Gram ujemnym oraz Gram dodatnim. Ponadto może indukować skurcz mięśni gładkich jelita cienkiego.[161] Nie wykazano w modelu Supervised Neural Network znamiennej istotności statystycznej w przypadku ekspresji zidentyfikowanego białka C4A, ekspresja zarówno w przypadku SIBO i grupy kontrolnej była porównywalna.

W modelu Quick Classifier o nieco niższych wartościach dyskryminujących również nie uzyskano istotności statystycznej dla żadnego pików. Dokonano identyfikacji pików zakwalifikowanych do klasyfikacji, czyli 1466.65 m/z [Da] – odpowiada fibrinogen alpha chain, 1584.96 m/z [Da] – inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 oraz 1568.57 m/z [Da] - kininogen-1, wartości p - value>0,05 we wszystkich testach. Zaobserwowano tendencję do wzrostu ekspresji łańcucha alfa fibrynogenu w grupie pacjentów z SIBO w porównaniu do grupy kontrolnej, nie odnotowano znamienych statystycznie różnic w ekspresji białka kininogen-1 czy inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4.

Kininogen - 1 - białko zidentyfikowane w modelu Quick Classifier jest znane jako czynnik antyangiogeny i hamujący proliferację komórek endotelium. Niektóre badania wykazują redukcję ekspresji kininogenu - 1 w badaniach proteomicznych moczu pacjentów z nowotworem piersi, szyjki macicy, jajnika czy nowotworami układu pokarmowego; jednak nie jest typowo specyficzny dla choroby nowotworowej, poziom ekspresji zmienia się także w ostrym zapaleniu trzustki czy nefropatii IgA. [162] Nie jest znany związek obecności kininogenu w przebiegu SIBO.

Wykazano tendencję do wyższej ekspresji białka mucyna 3A, fibrynogenu łańcuch alfa w przypadku SIBO oraz brak różnic w modelu Genetic Algorithm, jednak bez znamiennej istotności statystycznej

Porównując ponadto grupę kontrolną oraz SIBO nie uzyskano istotności statystycznych w zakresie poziomu albumin, białka całkowitego, CRP czy witaminy B12 w surowicy krwi (p odpowiednio: 0,303, 0,308, 0,519 oraz 0,425)

W porównaniu profili peptydowych surowic pacjentów z chorobą trzewną oraz z SIBO najwyższe wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania uzyskał model Supervised Neural Network. Nie uzyskano w tym modelu istotności statystycznej dla żadnego z pików zakwalifikowanych do identyfikacji. Zidentyfikowano podobne peptydy jak w poprzednich porównaniach; 1568.6 m/z [Da] - kininogen-1, 1655.68 m/z inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, 1526.62 m/z – serum deprivation-response protein oraz 1078.25 m/z, 1021.27 m/z i 2554.46 m/z jakofibrinogen alpha chain. Wykazano tendencję do

wzrostu ekspresji inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 w przypadku SIBO oraz serum deprivation-response protein w przypadku celiakii. Białko SDRP jest zaangażowane w przebieg procesów nowotworowych [156] stąd w celiakii można zaobserwować wzrost ekspresji.

Model Genetic Algorithm, również nie wykazał różnic istotnych statystycznie dla pików zakwalifikowanych do identyfikacji. Zidentyfikowano: 1655.68 m/z - inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 oraz pik 2022,25 m/z jako komplement C3.

Ostatni model Quick Classifier również nie wykazał istotności statystycznej w różnicowaniu poszczególnych pików.

Dokonując porównania wartości CRP grup chorych z celiakią oraz SIBO wykazano istotność na poziomie tendencji statystycznej $p=0,053$ oraz wykazano istotność statystyczną w zakresie poziomu albumin w surowicy krwi - średnia dla celiakii 4,28 g/dl, średnia dla SIBO 4,67 g/dl, $p=0,030$. Co istotne ponad połowa pacjentów z celiakią była na restrykcyjnej diecie bezglutenowej a średni czas od rozpoznania to około 5 lat, u pacjentów z SIBO objawy trwały zbyt krótko by wpłynąć negatywnie na wyniki poziomu albumin. Istotnym faktem jest ponadto wystąpienie celiakii dietoopornej, skrajnego niedożywienia oraz w następstwie zgonu jednej z osób biorącej udział w badaniu. Większość chorych z rozpoznaną celiakią będących na diecie bezglutenowej nie zgłaszało objawów ze strony układu pokarmowego. Badania sugerują, że ponad 55% osób przestrzega diety bezglutenowej, 18% pacjentów świadomie spożywa gluten, natomiast 21% robi to nieświadomie. [163] Wśród osób biorących udział w badaniu około 1/5 przyznawała się do świadomego spożywania glutenu.

Podsumowując w przypadku porównania grupy kontrolnej oraz pacjentów z chorobą trzewną w dwóch modelach uzyskano istotność statystyczną dla pików 3214,75 m/z [Da] – Quick Classifier - o najwyższych wartościach walidacji zewnętrznej oraz zdolności rozpoznawania i Supervised Neural Network – istotność statystyczna w dwóch testach, w jednym tendencja statystyczna. Co istotne - w modelu Quick Classifier uzyskano istotność statystyczną tylko dla jednego pików - wspomnianego już 3214,75 m/z [Da] i wykazano jego niższą ekspresję u pacjentów z celiakią, co może też korelować z obniżonym poziomem albumin i białka całkowitego w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w modelu Genetic Algorithm wykazywano tendencję do wzrostu ekspresji białka łańcuch alfa fibrynogenu.

Niektóre badania wykazują, że enzym transglutaminaza tkankowa bierze nie tylko udział w patogenezie celiakii, ale również w włóknieniu nerek, wątroby, serca czy płuc, zapalenia stawów poprzez aktywację cytokin promujących włóknienie takich jak TGF - β czy innych białek ostrej fazy, takich jak np fibrynogen. Transglutaminaza tkankowa najczęściej oddziałuje poprzez białka macierzy zewnątrzkomórkowej takie jak proteoglikany np siarczan heparanu.[164]

Analizując porównanie pacjentów z grupy kontrolnej oraz SIBO nie uzyskano pików istotnych statystycznie. Wykazano tendencję do zwiększonej ekspresji białka mucyna 3a u pacjentów z SIBO.

Nie wykazano istotności statystycznej w porównaniu profili peptydowych pacjentów z SIBO oraz celiakią; wykazano jedynie różnice w poziomie albumin w surowicy między grupami - $p=0,030$.

Nadal są próby prowadzenia badań proteomicznych u pacjentów z celiakią, sugeruje się między innymi udział białek szlaku PPAR czyli peroxisome proliferator-activated receptor czyli obniżenie ekspresji białek FABP1 i 2, APOC3 i PEPCK zwłaszcza u chorych ze stopniem II i III w skali Marsha, czego nie obserwowano u pacjentów ze stopniem 0 i I. Obserwowano także zaburzenia z zakresie białek PEBP1 i PRDX4 - co było związane ze znacznym uszkodzeniem nabłonka jelitowego oraz zaburzeń związanych ze szlakiem apoptozy. [165] Większość pacjentów zakwalifikowanych do badania miała w skali Marsh stopnie od 0 do 1, stąd może wynikać brak wystąpienia pików odpowiadających danym peptydom.

Inne badanie z wykorzystaniem metod proteomicznych - spektrometria MALDI TOF/TOF sugeruje, że substratem dla transglutaminazy tkankowej może być kinaza C delta. W badaniu wykazano podwyższony poziom przeciwciał przeciwko kinazie C delta. [166]

Badania proteomiczne coraz bardziej się rozwijają, jako nieinwazyjne narzędzie można je stosować w diagnostyce. Pik 3214,75 m/z [Da] może być potencjalnym markerem w diagnostyce celiakii - wykazano istotność statystyczną oraz o ponad 50 % niższą ekspresję tego piku właśnie u chorych na celiakię w porównaniu do grupy kontrolnej; ponadto jego obecność wykazały 2 modele. Z uwagi na liczebność grupy - 28 -osób pacjenci z celiakią, 30 z SIBO oraz 31 z grupy kontrolnej jest potrzeba przeprowadzenia dalszych i dokładniejszych badań. Nie wykorzystano również wszystkich dostępnych technik np. trawienia trypsyną i identyfikacji białek o masach powyżej 3500 Da.

5.2 Krytyka metody

Spektrometria mas jest metodą często wybieraną do analiz próbek o małej objętości. Metoda ta pozwala na wykrywanie substancji przy niskim ich stężeniu, zapewnia detekcję wielokierunkową, oznaczanie wielu klas materiałów czy wykonywanie badań ilościowych i jakościowych, ukierunkowanych i nieukierunkowanych. Istotną kwestią jest odpowiednie przygotowanie próbki obejmujące koncentrację, odsalanie czy frakcjonowanie. Podczas preparatyki może dojść do nieodwracalnego zniszczenia materiału, dlatego odpowiednie przygotowanie próbki jest kluczowe dla poprawnego wykonania badania. Dodatkowo obniżenie temperatury ma za zadanie stabilizację próbki. Często przeprowadza się rygorystyczne testy kontrolne oceniające zachodzące zmiany w materiale podczas preparatyki. [167]

Przygotowanie próbki do badania proteomicznego jest wieloetapowe i istnieje duże ryzyko wystąpienia błędów przedlaboratoryjnego – od hemolizy, poprzez przechowywanie materiału w nieodpowiednich warunkach temperaturowych czy utratę próbki już w trakcie preparatyki, dlatego ważne jest najszybsze schłodzenie materiału w celu jego stabilizacji. Istotną kwestią jest wykonywanie badań w sprawdzonym laboratorium z wykwalifikowanym personelem. Zebrana grupa nie do końca oddaje rozkład populacyjny;

wśród pacjentów jest duża przewaga kobiet, zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie z chorobą trzewną i SIBO. Grupy są natomiast wiekowo zbliżone do siebie.

Z uwagi na ograniczenia finansowe oraz sprzętowe do badania zakwalifikowano 89 osób z planowanych pierwotnie 150. Liczebność grup została podyktowana uwarunkowaniami sprzętowymi – jeden zestaw obejmuje 90 próbek, dodatkowo specyfika oddziału – ostre dyżury przyczyniła się do ograniczenia liczby pacjentów (mniej przyjęć planowych). Grupy dobierano tak, aby liczba pacjentów była porównywalna.

Założeniem badania było poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych zarówno dla choroby trzewnej jak SIBO. W niniejszym opracowaniu dokonano oznaczeń z wykorzystaniem najprostszej techniki analizy białek, z której zostały wykluczone białka o masie powyżej 3000 Da. Z uwagi na ograniczenia finansowe w badaniu nie wykorzystano technik z trawieniem białek np. trypsyną i po takiej procedurze prowadzenie dalszych oznaczeń. Metoda ta pozwoliłaby zidentyfikować białka o masie cząsteczkowej powyżej 3000 Da. Dalsze badania prawdopodobnie pozwoliłyby na identyfikację nowych markerów diagnostycznych dla celiakii oraz SIBO wśród białek o większych masach cząsteczkowych. Przeprowadzenie badań na większej grupie osób oraz z wykorzystaniem technik z trawieniem białek pozwoli na bardziej szczegółową analizę i zidentyfikowanie nowych markerów diagnostycznych wymienionych jednostek chorobowych.

6. Wnioski.

1. W porównaniu profili peptydowych pacjentów z chorobą trzewną oraz grupy kontrolnej uzyskano pik różnicujący 3214,75 m/z w dwóch modelach (QC i SNN), pik 4055,63 w modelu GA oraz piki 3192,87, 3284,87, 3303,28, 4373,42, 2933,24 w modelu SNN. Nie wykazano istotnych różnic w profilu peptydowym pacjentów grup SIBO/kontrola oraz celiakia/SIBO.
2. Zidentyfikowane białka należą do białek ostrej fazy, białek zaangażowanych w onkogenezę oraz w integralność ściany jelita. Spośród przeanalizowanych białek o masie cząsteczkowej poniżej 3500 Da zidentyfikowano complement C3, fibrinogen alpha chain, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, kininogen -1, mucin 3a oraz serum deprivation-response protein.
3. Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniach albumin w porównaniu między grupami celiakia/SIBO. Pacjenci z celiakią wykazywali niższe stężenia. Nie wykazano różnic w porównaniach stężenia CRP czy poziomu białka całkowitego.
4. Na podstawie wykonanych badań można stwierdzić, że patogeneza jest wieloczynnikowa i nie do końca poznana - uzyskano w identyfikacji białka zaangażowane kaskadę procesu zapalnego (dopełniacz C3 oraz łańcuch alfa fibrynogenu) oraz w onkogenezę (kininogen – 1 oraz białko serum response deprivation protein –) – są to białka odpowiedzialne za transdukcję sygnału
5. Zmniejszona ekspresja piku 3214,75 u pacjentów z chorobą trzewną w porównaniu do grupy kontrolnej o 50% w dwóch modelach może sugerować wykorzystanie białka 3214,75 jako potencjalnego markera celiakii.

7. Streszczenie.

Zespół zaburzeń wchłaniania obejmuje wiele jednostek klinicznych, które prowadzą do przewlekłych biegunek, wzdęć oraz niedożywienia, a zaburzenia te mogą być wrodzone lub nabyte. Celiakia jest szczególnym typem zespołu zaburzeń wchłaniania, patogeneza jest wieloczynnikowa i nie do końca jeszcze poznana. Objawy wywoływane są przez spożycie glutenu u osób predysponowanych. SIBO definiowane jest jako wzrost liczby bakterii jelicie czczym do ponad 10^5 komórek w aspiracie jelitowym. W obu jednostkach chorobowych napotyka się na trudności diagnostyczne, a brak rozpoznania prowadzi do poważnych powikłań.

Celem pracy była ocena profili peptydowych pacjentów z chorobą trzewną, SIBO oraz grupy kontrolnej. Podjęto także próby identyfikacji białek oraz wskazanie potencjalnego, nowego markera diagnostycznego. Dodatkowo dokonano porównania między grupami wybranych parametrów laboratoryjnych.

Do badania zostało zakwalifikowanych 89 pacjentów, zarówno kobiet jak i mężczyzn, prezentujących objawy zespołu zaburzeń wchłaniania hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii, Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki lub leczonych ambulatoryjnie w Poradni Przyklinicznej. Wśród zakwalifikowanych pacjentów do badania 28 osób miało rozpoznaną chorobę trzewną w momencie przyjęcia do szpitala lub rozpoznanie postawiono po zakończonej hospitalizacji; 31 pacjentów zostało zakwalifikowanych do grupy określonej mianem zespół zaburzeń wchłaniania – w badaniach wykluczono celiakię, natomiast wykazano obecność SIBO; trzecia grupa stanowiła grupę kontrolną w liczbie 30 osób, gdzie wykluczono zarówno celiakię jak i obecność SIBO. Od wszystkich chorych pobrano świadomą zgodę na badanie oraz zabezpieczono 500 mikrolitrów surowicy. Po odpowiedniej preparatyce dokonano analizy proteomicznej peptydów z wykorzystaniem spektrometru MALDI – TOF/TOF oraz zidentyfikowano wybrane peptydy oraz porównano grupy między sobą. Wyniki zostały poddane szerokiej analizie statystycznej.

Uzyskano istotną statystycznie różnicę dla piku 3214,75 m/z [Da] w porównaniu celiakii z grupą kontrolną. W przypadku modelu Quick Classifier uzyskano białko różnicujące o masie cząsteczkowej 3214,75 (test Wilcoxona p value = 0,0113, test Anderson - Darling p- value = 0,000109) oraz tendencji statystycznej wykazanej w tście T-Studenta (p value na granicy istotności statystycznej = 0,0537). W modelu Genetic Algorithm uzyskano różnicę istotną statystyczną dla piku 4055,63 –(test Wilcoxona p value = 0,0411 oraz test Anderson – Darling p value = 0,00423). Model Supervised Neural Network o najniższych wartościach walidacji krzyżowej i zdolności rozpoznawania wykazał jako istotne piki o masach 3192,87, 3284,87, 3303,28, 4373,42, 2933,24. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w porównaniu surowic pacjentów celiakia/SIBO czy SIBO/grupa kontrolna. W porównaniu parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami różnicę istotną statystycznie wykazano w stężeniu albumin pomiędzy grupami celiakia/SIBO

Zidentyfikowane białka należą do białek z grupy białek ostrej fazy lub szlaków związanych z transdukcją sygnału/onkogenezą. Pik 3214,75 może być potencjalnym markerem choroby trzewnej – u osób chorych ekspresja była mniejsza o 50% w porównaniu do osób zdrowych

Do czynników ograniczających należą liczebność grupy oraz zastosowanie najprostszej metody badawczej z wykluczeniem trawienia trypsyną. Dodatkowo do wykonywania badań konieczna jest wykwalifikowana kadra, niemniej wyniki wydają się być obiecujące.

8. Summary.

Evaluation of the peptide profile in patients with celiac disease and malabsorption syndrome

The malabsorption syndrome includes many clinical units that lead to chronic diarrhea, bloating and malnutrition, and these disorders can be congenital or acquired. Celiac disease is a special type of malabsorption syndrome, pathogenesis is multifactorial and not yet fully understood. Symptoms are caused by gluten intake in predisposed individuals. SIBO is defined as the increase in the number of jejunum bacteria by more than 10^5 cells in the intestinal aspirate. In both diseases, diagnostic difficulties are encountered, and the lack of diagnosis leads to serious complications.

The study aimed to assess peptide profiles of patients with celiac disease, SIBO, and the control group. Attempts have also been made to identify proteins and to identify a potential new diagnostic marker. Also, a comparison was made between groups of selected laboratory parameters.

89 patients, both men, and women were qualified for the study, presenting the symptoms of the malabsorption disorder syndrome hospitalized in the Gastroenterology Clinic or outpatient in the Outpatient Clinic. Among the patients qualified for the study, 28 patients had a celiac disease at the time of admission or were diagnosed after hospitalization; 31 patients were included in the group of malabsorption syndrome – celiac disease was excluded in the studies, while SIBO was shown; the third group is a control group of 30 people, where both celiac disease and the presence of SIBO were excluded. All patients received informed consent and 500 microliters of serum were secured. After appropriate preparation, a proteomic analysis of peptides was performed using the MALDI - TOF / TOF spectrometer and selected proteins were identified. Groups were compared among themselves. The results were subject to extensive statistical analysis.

A statistically significant difference was obtained for the 3214.75 m / z [Da] peak compared to control and celiac disease. The Quick Classifier model produced a 3214,75 molecular weight protein (Wilcoxon test p-value = 0.0113, Anderson - Darling p test - value = 0.000109) and the statistical trend shown in the Student's T-test (p-value on the border of statistical significance = 0.0537). In the Genetic Algorithm model, a statistically significant difference was obtained for the peak 4,555.63 - (Wilcoxon test p-value = 0.0411 and Anderson test - Darling p-value = 0.00423). The Supervised Neural Network model with the lowest cross-validation values and recognition ability showed significant peaks with masses 3192.87, 3284.87, 3303.28, 4373.42, 2933.24. There were no statistically significant differences compared to the celiac disease / SIBO

or SIBO / control sera. In the comparison of laboratory parameters between the groups, a statistically significant difference was shown in the albumin concentration between the celiac disease / SIBO groups. The identified proteins belong to proteins from the group of acute-phase proteins or pathways associated with signal transduction/oncogenesis. Peak 3214.75 may be a potential marker of celiac disease - 50% lower expression in healthy people compared to healthy people.

Limiting factors include the size of the group and the use of the simplest research method, excluding trypsin digestion. In addition, qualified staff is required to perform the tests, but the results seem promising.

Literatura:

1. Nolan, J.D., Johnston I.M., Walters J. RF.: Physiology of malabsorption. *Surgery* 2015, vol 33, (5) 193-199.
2. Siddiqui Z., Osayande A.S.: Selected Disorders of Malabsorption. *Prim Care Clin Office Pract* 38 (2011) 395–414.
3. Jamal S., Iftikhar R.: Celiac disease in adults. *Pak Armed Forces Med. J* 2016;66(4):600-05.
4. Lionetti E., Gatti S., Pulvirenti A. i wsp. : Celiac disease from a global perspective. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2015, 29: 365 – 379.
5. Strzeszyński Ł., Szajewska H.: Rozpoznawanie i leczenie celiakii u dorosłych według wytycznych British Society of Gastroenterology 2014, dostęp on - line: <http://www.mp.pl/gastrologia/wytyczne/111919,roznpoznowanie-i-leczenie-celiakii-u-doroslych-wedlugwytychyticznych-british-society-of-gastroenterology-2014>.
6. Miazga A. Osiński M., Cichy W. i wsp.: Current views on the ethiopathogenesis, clinical manifestation, diagnosis, treatment and correlation with other nosological entities of SIBO. *Advances in Medical Science* 60 (2015) 118-124.
7. Reinaldo A., Murdani A. : Celiac Disease. *The Indonesian Journal of Gastroenterolgy, Hepatology and Digestive Endoscopy*. Vol. 18, nr 3, Dec 2017, 177-183
8. Leonard M.M., Sapone A., Catassi C. i wsp.: Celiac disease and Non Celiac Gluten Sensivity. A Review. *JAMA*, 2017; 318(7): 647-656
9. Kaniewska M., Rydzewska G.: Choroba trzewna u dorosłych – patogeneza, manifestacje kliniczne, współistnienie z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i innymi chorobami o podłożu immunologicznym. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2009; 4 (4): 173-177
10. Interna Szczeklika – mały podręcznik pod redakcją P. Gajewskiego. Rozdział 4 – Bartnik W., podrozdział 10 – Szajewska H. – Celiakia. *Medycyna praktyczna*, Kraków 2012, 462-463.
11. Rashtak S., Murray J.A.: Celiac Disease in the Eldery. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2009 Sept: 38 (38): 433-446.
12. Satora D., Bochen K., Prystupa A. i wsp.: Celiakia – choroba nie tylko dziecięca. *Family Medicine & Primary Care Review* 2011, 13, 1: 90-94
13. Cabrera - Chavez F., Granda Restrepo D.M., Aramburo – Galvez J.G. i wsp.: Self-Reported Prevalence of Gluten – Related Disorders and Adherence to Gluten Free Diet in Columbian Adult Population. *Gastroenterology Research & Practice* 2016, Article ID 4704309, 8 pages
14. Mashayekhi K., Rostami – Nejad M., Amani D. i wsp.: A rapid and sensitive assay to identify HLA-DQ2/8 risk alleles for celiac disease using real- time PCR method. *GastroenterolHepatol Bed Bench* 2018; 11(3): 250-258.

15. Murad H., Jazairi B., Khansaa I. i wsp.: HLA – DQ2 and -DQ8 genotype frequency in Syrian celiac disease children: HLA -DQ relative risk evaluation. *BMC Gastroenterology* 2018, 18:70
16. Fardet A.: Wheat – based foods and non – celiac gluten/wheat sensitivity: is drastic processing the main key issue? *MedicalHypotheses* 85 (2015) 934-939.
17. Bubis E., Przetaczek – Rożnowska I.: Gluten i choroby wynikające z jego nietolerancji. *Kosmos* 2016, 65, nr 2 (311) 293-302.
18. Fric P., Gabrovská D., Nevoral J.: Celiac disease, gluten – free diet, and oats. *Nutrition Reviews*, 2011 vol.69(2):107-115
19. Ribeiro M., Rodriguez – Quijano M., Nunes M. F. i wsp.: New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease`s immunostimulatory epitopes. *Food Chemistry* 213 (2016) 8-18.
20. Escarnot E., Gofflot S., Sinnaeve G. i wsp.: Reactivity of gluten proteins from spelt and bread wheat accessions towards A1 and G12 antibodies in the framework of celiac disease. *Food Chemistry* 268 (2018) 522-532
21. Malalgoda M., Meinhardt S. W., Simsek S.: Detection and quantitation of immunogenic epitopes related to celiac disease in historical and modern hard red spring wheat cultivars. *Food Chemistry* 264 (2018) 101-107.
22. Malalgoda M., Simsek S.: Celiac disease and cereals proteins. *Food Hydrocolloids*.68 (2017) 108-113.
23. De Re V., Caggiari L., Tabuso M. i wsp.: The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. *Clinical Biochemistry* 46 (2013) 552-560.
24. Fleur du Pre M., Solid L. M.: T – cell and B – cell immunity in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29 (2015) 413-423.
25. Bierła J.B., Trojanowska I., Konopka E. i wsp.: Diagnostyka celiakii oraz badania przesiewowe w grupach ryzyka. *Diagn Lab* 2016; 52(3): 205-210
26. Santaguida M.G., Gatto I., Mangino G. i wsp.: Breg Cells in Celiac Disease Isolated or Associated to Hashimoto`s Thyroiditis. *International Journal of Endocrinology*, vol 2018, Article ID 5290865 6 pages
27. Sood A., Midhresa V., Makharia; G. i wsp.: A simple phenotypic classification for celiac disease. *Intest Res* 2018; 16(2): 288-292
28. Kaswala D.H., Veeraghavan G., Kelly C.P. i wsp.: Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases* 2015, 3: 86-101
29. Mahadev S., Laszkowska M., Sundstrom J. i wsp.: Prevalence of Celiac Disease in Patients With Iron Deficiency Anemia – A Systematic Review With Meta – analysis. *Gastroenterology* 2018; 155: 374-382.

30. Vivas S., Vaquero L., Rodriguez – Martin L. i wsp.: Age – related differences in celiac disease: specific characteristics of adult presentation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015 Nov 6; 6(4): 207-212.
31. Cappello M., Morreale G.C., Licata A.: Eldery Onset Celiac Disease: A Narrative Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology* 2016;9: 41-49.
32. Pawlaczyk M., Milewska S., Rokowska – Waluch A. i wsp.: Leczenie dietetyczne w celiakii i opryszczkowatym zapaleniu skóry. *Farmacja współczesna* 2012; 5:9-20.
33. Topal E., Catal F., Yildirim Acar N. i wsp.: Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease. *Turk j Med. Sci* (2015) 45: 833-836
34. Szajewska H.: Celiakia. W *Szczeklik podręcznik on-line*, aktualizacja 06.08.2018 doi: <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.4.10>.
35. Tonutti E., Bizzaro N.: Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensivity. *Autoimmunity Reviews* 13 (2014) 472-476.
36. Rasheed J, Khan T., Khalid M. i wsp.: Celiac disease; a medley of clinical features a tertiary care hospital experience. *Professional Med. J* 2018; 25(5): 669-675.
37. Wolf j., Petroff D., Richter T. i wsp.: Validation of antibody based strategies for diagnosis of pediatric celiac disease without biopsy. *Gastroenterology* 2017; 153:410-419.
38. Choung R.S., Rostamkolaei S. K., Ju J.M. i wsp.: Synthetic Neoepitopes of the Transglutaminase – Deamidated Gliadin Complex as Biomarkers for Diagnosing and Monitoring Celiac disease. *Gastroenterology* 2019; 1-10.
39. Husby S., Koletzko S., Korponay – Szabó I.R. i wsp.: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Celiac Disease. *JPGN* vol 54, 1, Jan 2012.
40. Yamada T. *Podręcznik Gastroenterologii*, wydanie polskie pod redakcją Panas – Małeckiej E. Wydawnictwo Czelej Lublin 2006, rozdział 39, str 374-379.
41. Szaflarska -Czerwionka M., Szaflarska – Popławska A., Muller L.: Choroba trzewna dzieci i dorosłych. *Alergia* 2/2006, 20-24
42. Penny H. A., Mooney P.D., Burden M i wsp.: High definition endoscopy with or without I – scan increas the detection of celiac disease during routine endoscopy. *Digestive and Liver Disease* 48 (2016) 644-649.
43. Mooney P.D., Kurien M., Evans K.E. i wsp.: Cechy kliniczne oraz immunologiczne choroby trzewnej z zajęciem ultrakrótkiego odcinka jelita. *Gastroenterology* 2016; 150(5):1125-34 w *Falk Gastro ReviewJournal* 4/16 10.
44. Dixit R., Lebwohl B., Ludvigsson J.F. i wsp.: Celiac disease is diagnosed less frequently in young adult males. *DigDisSci* (2014) 59:1509-1512.

45. Lerner A., Matthias T.: Increase knowledge and awareness of celiac disease will benefit the elderly. *International Journal of Celiac Disease* 2015, vol 3(3):112-114.
46. Kowalski K., Mulak A., Jasińska M. i wsp.: Diagnostic challenges in celiac disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2017;26(4):729-737.
47. Turner J.M.: Diagnosis of celiac disease: taking bite out of the controversy. *Digestive Diseases and Sciences* (2018) 63: 1384-1391.
48. Aziz I., Peerally M., Barnes J.H. i wsp.: The clinical and phenotypical assessment of seronegative villous atrophy; a prospective UK centre experience evaluating 200 adult cases over a 15 – year period (200-2015). *Gut* 2017; 66:1563-1572.
49. Schuppan D., Pickert G., Ashfaq-Khan M. i wsp.: Non-celiac wheat sensitivity: differential diagnosis, triggers and implications. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29 (2015) 469 -476.
50. Rathi P.M, Zanwar V.G.: Non-celiac gluten sensitivity (NGCS). *Journal of The Association of Physicians of India* 2016, vol 64.
51. Źródłak M.: Pacjencie, radź sobie sam. Bez glutenu. *Magazyn wydawany przez celiakia.pl*, 2019, 10: 10-13.
52. Ghoshal U.C, Ghoshal U.: Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Other Intestinal Disorders. *Gastroenterol Clin N Am* 46 (2017) 103-120.
53. Maslennikov R., Pavlov Ch., Ivashkin V.: Small intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis: systematic review and meta-analysis. *Hepatology International* (2018) 12: 567-576.
54. Quigley E. M.M., Abu-Shanab A.: Small intestinal bacterial overgrowth. *Infect Dis Clin N Am* 24 (2010) 943-959.
55. Gąsiorowska J., Czerwonka – Szaflarska M.: Zespół przerostu flory bakteryjnej jelita cienkiego a zespół jelita nadwrażliwego. *Prz Gastroenterol* 2013; 8 (3): 165-171.
56. Amer S.: Small intestinal bacterial overgrowth in the elderly: an often Missed Entity. *Indian Journal of Gastroenterology* 2015 vol 29, (4): 387-397
57. Nababan T., Fauzi A.: Diagnosis and treatment of small intestinal bacterial overgrowth. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy*, 2015, 16(2):105-111
58. Adike A., DiBaise J.K.: Small Intestinal Bacterial Overgrowth. Nutritional Implications, Diagnosis, and Management. *Gastroenterol Clin N Am* 47 (2018) 193-208.
59. Quigley E. M.M.: The spectrum of small intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO). *Current Gastroenterology Reports* (2019) 21:3
60. Fialho A., Fialho A., Thota P. i wsp.: Higher visceral to subcutaneous FAT ratio is associated with small intestinal overgrowth. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease* (2016) 26 773-777

61. Fialho A., Fialho A., Thota P. i wsp.: Small intestinal Bacterial Overgrowth is associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Gastrointestin Liver Dis*, June 2016, vol 52 (2): 159-165.
62. Lo W.-K., Chan W.W.: Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013;11: 483-490
63. Giamarellos – Bourboulis E.J., Pyleris E., Barbatzas C.: Small intestinal bacterial overgrowth is associated with irritable bowel syndrome and is independent of proton pump inhibitor usage. *BMC Gastroenterology* (2016) 16:67.
64. Rao S.S., Rehman A., Yu S. i wsp.: Brain fog, gas and bloating: a link between SIBO, probiotics and metabolic acidosis. *Clinical and Translational Gastroenterology* (2018) 9:162
65. Sachdeva S., Rawat A.K., Reddy R.S. i wsp.: Small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in irritable bowel syndrome: frequency and predictors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 (2011) 3:135-138.
66. Mollar A., Villanueva M.P., Nunes E. i wsp.: Hydrogen and methane – based breath testing outcomes in patients with heart failure. *Journal of Cardiac Failure* vol 00, 00 2018.
67. Rana S.V., Malik A.: Hydrogen breath tests in gastrointestinal diseases. *Ind J Clin Biochem* (Oct-Dec 2014) 29(4):398-405.
68. Abadi A.T.B.: Small intestinal bacterial overgrowth and rifaximin: an update. *Govaresh*, vol 23 No 4 – winter 2019.
69. Kalighi A.R., Kalighi M.R., Behdani R. i wsp.: Evaluating the efficacy of probiotic on treatment in patients with small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) – a pilot study. *Indian J Med. Res* 140, 2014: 604-608.
70. Di Stefano M., Mengoli C., Bergonzi M. i wsp.: Hydrogen breath test in patients with severe constipation: the interference of the mixing of intestinal content. *Neurogastroenterol Motil* (2014) 26 1754-1760.
71. Nowak M., Gulbicka P., Grzymisławski M.: Wodorowe testy oddechowe jako narzędzie w diagnostyce schorzeń gastroenterologicznych. *Forum zaburzeń metabolicznych* 2015;6(3):124-135.
72. Di Stefano M., Certo M., Colecchia A. i wsp.: H₂ – breath tests: methodological audits in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther* 29, 2009, 8-13 w : Rpmc consensus : H₂ – breath testing in GI diseases.
73. Lin E.C., Massey B.T.: Scintigraphy Demonstrates high rate of false-positive results from glucose breath tests for small bowel bacterial overgrowth. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2016; 14: 203-208.
74. Sunny J.K., Garcia J.C., McCallum R.W.: Interpreting the lactulose breath test for the diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. *Am J Med. Sci* 2016;351(3): 229-232.

75. Gibson P.R., Barret J.S., Nut.Diet M.: The concept of small bowel bacterial overgrowth in relations to functional gastrointestinal disorders. *Nutrition* 26 (2010) 1038 -1043
76. Jirapinyo P., Makuvire T.T., Dong W.Y i wsp.: impact of oral – cecal transit time on the interpretation of lactulose breath tests after RYGB: a personalized approach to the diagnosis of SIBO. *Obesity surgery*, <https://doi.org/10.1007/s11695-018-3575-3> , published on-line 09. January 2018.
77. Rao S.C., Tan G., Abdulla H. i wsp.: Does colectomy predispose to small intestinal bacterial (SIBO) and fungal overgrowth (SIFO)? *Clinical and Translational Gastroenterology* (2018)9:146.
78. Szajewska H.: Zespół rozrostu bakteryjnego w: *Interna. Choroby przewodu pokarmowego. Weryfikacja* – 06.08.2018.
79. Altenbach S.B., Vensel W.H., DuPont F.M.: Integration of transcriptomic and proteomic data from a single wheat cultivar provides new tools for understanding the roles of individual alpha gliadin proteins in flour quality and celiac disease. *Journal of Cereal Science* 52(2010) 143-151.
80. Efsthathiou G., Antonakis A.N., Pavlopoulos G.A. i wsp.: ProteoSign: an end-user online differential proteomics statistical analysis platform. *Nucleic Acids Research* 2017, vol 45 300-306
81. Uvackova L., Skultety L., Bekesova S. i wsp.: The MS^E – proteomic analysis of gliadins and glutenins in wheat grain identifies and quantifies proteins associated with celiac disease and baker's asthma. *Journal of Proteomics* 93 (2013) 65-73.
82. MacCoss M.J., Wu C.C.: Proteomic solutions for analytical challenges associated with alcohol research. *Technologies from the Field*, 31, 3 2008: 251-255.
83. Ferranti P., Mamone G., Picariello G. i wsp.: Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *Journal of Mass Spectrometry* 2007; 42: 1531-1548.
84. De Re V., Simula M.P., Canzonieri V. i wsp.: Proteomic analyses lead to a better understanding of celiac disease: Focus on epitope Recognition and autoantibodies. *Dig Dis Sci* (2010) 55:3041-3046.
85. Ryan D., Newnham E.D., Prenzler P.D. i wsp.: Metabolomics as a tool for diagnosis and monitoring in coeliac disease. *Metabolomics* (2015) 11:980-990
86. Ruoppolo M., Orru S., D'Amato A. i wsp.: Analysis of transglutaminase protein substrates by functional proteomics. *Protein Science* (2003) 12: 1290-1297.
87. Płodzich A.: Proteomika i jej zastosowanie w wybranych jednostkach chorobowych. *J. Transf. Med.* 2013; 6: 48–59.
88. Bromilow S., Gethings L.A., Buckley M. i wsp.: A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. *Journal of Proteomics* 163 (2017) 67-75.
89. Stulik J., Hernychova L., Porkertova S i wsp.: Identification of new celiac disease autoantigens using proteomic analysis. *Proteomics* 2003, 3, 951-956.

90. Lewis N.R., Holmes G.K.T. Morbidity and mortality Associated with celiac disease. W: Rampertab S. D., Mullin G. E.: Celiac Disease. Humana Press, New York 2014, Chapter 15: 209-231.
91. Rubio -Tapia A., Kyle R. A., Kaplan E. L. i wsp.: Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology* 2009; 137:88-93.
92. Godfrey J.D., Brantner T.L., Brinjikji W. i wsp.: Morbidity and mortality among older individuals with undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology* 2010; 139:763-769.
93. Sanders D.S., Patel D., Stepherson T.J. i wsp.: A primary care cross-sectional study of undiagnosed adult coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003, 15:407-413.
94. Choung R.S., Larson S. A., Khaleghi S. i wsp.: Prevalence and morbidity of undiagnosed celiac disease from a community-based study. *Gastroenterology* 2017; 152: 830-839.
95. Howard M. R., Turnbull A.J., Morley P. i wsp.: A prospective study of the prevalence of undiagnosed celiac disease in laboratory defined iron and folate deficiency. *J Clin Pathol* 2002;55:754-757.
96. Halfdanarson T.R., Litzow M.R., Murray J.A.: Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood Journal* 2007; 109: 412-421.
97. Cioni G.: Celiac disease presenting as fever of unknown origin in the adult: The role of undiagnosed celiac disease in systemic atherosclerosis. *Polish Annals of Medicine* 2018;25(2): 241-244.
98. Gajulapalli R. D., Pattanshetty D.J.: Risk of coronary artery disease in celiac disease population. *Saudi Journal of Gastroenterology* 2017 23(4): 253 – 258.
99. Samy L. Barkun A., Huynh T.: Cardiac syncope in woman with undiagnosed celiac disease. *CMAJ* 2017 6;189: 365-7.
100. Not. T., Tommasini A., Tonini G. i wsp.: Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with type I diabetes melitus. *Diabetologia* 2001 44:151-155.
101. Walter M., McDonald G.C., Paty B.i wsp.: Prevalence of autoimmune diseases in islet transplant candidates with severe hypoglycaemia and glycemic lability: previously undiagnosed celiac and autoimmune thyroid disease is identified by screening. *Diabetic Medicine* 2007, 24, 161-165.
102. Rachel O.: Celiac disease and its consequences on bone mineral density and osteoporosis. *The Original Internist* 2017:35-39.
103. Dos Santos S., Liote F.: Osteoarticular manifestations of celiac disease and non-celiac gluten hypersensitivity. *Joint Bone Spine* 84 (2017) 263-266.
104. Kozak-Krupa U.: Pathologic bone alternations in celiac disease: etiology, epidemiology and treatment. *Nutrition* 30 (2014) 16-24.

105. Nuti R., Martini G., Valenti R. i wsp.: Prevalence of undiagnosed coeliac syndrome in osteoporotic women. *Journal of Internal Medicine* 2001; 250:361-366.
106. Saccone G., Berghella V., Sarno L. i wsp.: Celiac disease and obstetric complications: a systemic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetric & Gynecology* 2016 /February 225-234.
107. Sharshiner R., Romero S.T., Bardsley T.R. i wsp.: Celiac disease serum markers and recurrent pregnancy loss. *Journal of Reproductive Immunology* (2013) 104-108.
108. D'Ippolito S., Gasbarini A., Castellani R. i wsp.: Human leukocyte antigen (HLA) DQ2/DQ8 prevalence in recurrent pregnancy loss women. *Autoimmunity Reviews* (2016) 638-643.
109. Arakeri G., Arali V., Brennan P.A.: Cleft lip and palate: an adverse pregnancy outcome due to underdiagnosed maternal and paternal coeliac disease. *Medical Hypotheses* 75 (2010) 93-98.
110. Cacci C., Cavallaro R., Romano R. i wsp.: Increased risk of surgery in undiagnosed celiac disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2001 vol 46, 10: 2206-2208
111. Jamma S., Rubio – Tapia A., Kelly C.P. i wsp.: Celiac Crisis is a rare but serious complication of celiac disease in adults. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2010; 8:587-590.
112. Malamut G., Cellier C.: Complication of coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29 (2015) 451-458.
113. Hrdlickowva B., Mulder C.J., Malamut G. i wsp.: A locus at 7p14.3 predisposes to refractory celiac disease progression from celiac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2018 30:828-837.
114. Freeman T.J.: Adult celiac disease and its malignant complications. *Gut and Liver* 2009 vol 3, 4: 237-246.
115. Malamut G., Cellier C.: Refractory Celiac Disease. *Gastroenterol Clin N Am* 48 (2019) 137-144.
116. Brousse N., Meijer J.W.R.: Malignant complications of coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2005, vol 19, 3: 401-412.
117. Lasa L., Rausch A., Bracho L.F. i wsp.: Colorectal adenoma risk is increased among recently diagnosed adult celiac disease patients. *Gastroenterology Research & Practice* 2018, article ID 6150145, 5 pages.
118. Van Gils Tom, Nijeboer P., Overbeek L. i wsp.: Risks for lymphoma and gastrointestinal carcinoma in patients with newly diagnosed adult – onset celiac disease: consequences for follow - up. *United European Gastroenterology Journal* 2018 6(10):1485-1495.

119. Chandersris M.O., Malamut G., Verkarre V. i wsp.: Enteropathy – associated T- cel lymphoma: a review on clinical presentation, diagnosis, , therapeutic strategies and perspectives. *Gastroenterologie Clinique et Biologie* (2010) 34, 590-605.
120. Ettersprenger J., Montcuquet N., Malamut G. i wsp.: Interleukin – 15 dependent T – cel - like innate intraepithelial lymphocytes develop in the intestine and transrorm into lymphomas in celiac disease. *Immunity* 2016 45, 610-625.
121. Malamut G., Cerf-Bensussan N., Meresse B.: IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potentiak new trget in celiac disease – associated inflammation and lymphomagenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120(6): 2131-2143.
122. Freeman H.J.: Celiac disease and selected long – termhealth issues. *Maturitas* 73 (2012) 206-211
123. Dąbrowski K.: Spektrometria mas MALDI – TOF/TOF. Katedra Chemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny PW, Warszawa 2012
124. Swiatly A., Horala A., Hajduk A. i wsp.: MALDI – TOF – MS analysis in Discovery and indentification of serum proteomic patterns of ovaria cancer. *BMC Cancer* (2017), 17:472.
125. Klupczynska A., Swiatly A., Hajduk J. i wsp.: Identification of serum peptidome signatures of non-small cell lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*,2016, 17, 410.
126. ClinProTools 3.0. User Manual. Basics on Data Preparation, Model Generation and Spectra Classification. Bruker Daltonik GmbH. 62-75
127. Nedel’ko V.M. : Statistical Fitting Criterion on The Basis of Cross-Validation Estimation. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2018, Vol. 28, No. 3, pp. 510–515.
128. https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/pl/SS3RA7_sub/modeler_mainhelp_client_ddita/clementine/knn_node_settings_crossval.html.
129. Krzywonos A.: Rola badań proteomicznych w diagnostyce klinicznej. *Journal of Laboratory Diagnostic* (2010), Volume 46, 4 pp: 411-414.
130. Kossowska B., Dutka I., Gancarz R i wsp.: Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2009; 63: 549-563.
131. Tavirani M.R., Bashash D., Rostami F.T. i wsp.: Celiac disease microarray analysis based on System Biology Approach. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2018;11(3):216-224.
132. Sparbier K., Wenzel T., Dihazi H.: Immuno – MALDI – TOF MS: New perspectives for clinical applications of mass spectrometry. *Proteomics* 2009, 9, 1442-1450.
133. Clark R., Johnson R.: Malabsorption Syndromes. *NursClin N Am* 2018.
134. Canova C., Pitter G., Zanier L. i wsp.: Risk of fractures in youth with celiac disease – a population – based study. *The Journal of Pediatrics* 2018, vol 198, 117-120.

135. Paez M.A., Gramelspacher A.M., Sinacore J. i wsp.: Delay in diagnosis of celiac disease in patients without gastrointestinal complaints. *The American Journal of Medicine* (2017) 130, 1318-1323.
136. Marciano F., Savoia M., Vajro P.: Celiac disease – related hepatic injury: Insights into associated conditions and underlying pathomechanisms. *Digestive and Liver Disease*, 48 (2016) 112-119.
137. Volta U., Caio G., Boschetti E. i wsp.: Seronegative celiac disease: Shedding light on an obscure clinical entity. *Liver Disease*, 48 (2016) 1018-1022
138. Jansson – Knodell C.L., Hujoel I.A., Rubio – Tapia A. i wsp.: Not all that flattens villi is celiac disease: a review of enteropathies. *Mayo Clin Proc* 2018; 93(4): 509-517.
139. Branchi F., Locatelli F., Tomba C. i wsp.: Enteroscopy and radiology for the management of celiac disease complications: Time for pragmatic roadmap. *Liver Disease*, 48 (2016) 578-586.
140. Tziatzios G., Giamarellos - Bourboulis E.J., Papanicolaou I.S. i wsp.: Is small intestinal bacterial overgrowth involved in the pathogenesis of functional dyspepsia? *Medical Hypotheses* 106 (2017) 26-32.
141. Sabarinathan R., Premkumar K., Kani S.M. i wsp.: A study on the role of small intestinal bacterial overgrowth in patients with functional dyspepsia. *IAIM* 2017; 4(5):88-97.
142. Mei Z., Hong-Ming Z., Fang H. i wsp.: Association between acute pancreatitis and small intestinal bacterial overgrowth assessed by hydrogen breath test. *World J Gastroenterol* 2017 28 23(48): 8591-8596.
143. Li Z., Wei W., Jun B. i wsp.: Proteomic analysis associated with coronary artery dilatation caused by Kawasaki disease using serum exosomes. *Rev Port Cardiol.* 2016;35(5):265-273.
144. Aili H., Ju B., Chen H. i wsp.: Detection of serum markers in multiple myeloma using the CLINPROT system. *Int J Hematol* (2012) 95:668-674.
145. Dostalek P., Gabrovská D., Rysova J. i wsp.: Determination of gluten in glucose syrups. *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (2009) 762-765.
146. Ergseng E., Dørum S., Arntzen M.Ø. i wsp.: Different Winding motifs of the celiac disease-associated HLA molecules DQ2.5, DQ2.2 and DQ7.5 revealed by relative quantitative proteomics of endogenous peptide repertoires. *Immunogenetics* (2015) 67:73-84.
147. Azodi M.Z., Peyvandi H., Rostami-Nejad M. i wsp.: Protein-protein interaction Network of celiac disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9(4): 268-277.
148. De Re V., Simula M.P., Gacciari L. i wsp.: Protein expression profile of celiac disease patient with aberrant T cell by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Ann N.Y. Acad. Sci* 1109: 429-440 (2007).

149. Thiese M.S., Ronna B., Ort U.: P value interpretations and considerations. *J Thorac Dis* 2016;8(9) E928-E931.
150. Xiao J., Xiao-Yan B, Bowen L. i wsp. :Plasma Inter-alpha tri psin inhibitor heavy chains H3 and H4 serve as novel diagnostics Biomarkers in human colorectal cancer. *Hindawi Disease Markers* 2019 Article ID 50696614.
151. Lebwohl B., Stavsky E., Neugut A.I i wsp.: Risk of colorectal adenomas in patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2010; 32:1037-1043.
152. Choong-Kyun N., Soon S.S, Dong-Kyu K. i wsp.: Inter- alpha – trypsin inhibitor heavy chain H4 as a diagnostics and prognostic indicato in patients with hepatitis B virus-assoxiated hepatocellular carcinoma. *Clinical Biochemistry* 47 (2014) 1257-1261.
153. Zöller-Utz I.M., Schulze-Krebs A. i wsp. : Natural Hidden Autoantibodies to Tissue Transglutaminase Cross-React with Fibrinogen. *J ClinImmunol* (2010) 30:204–212
154. Da Rosa Utiyama S.R., Da Silva Kotze L.M., De Messias Reason I.T.: Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity od celiac disease in pasiensts and relatives. *Inetrnational Journal of Immunogenetics* 2005, 32, 307-314.
155. Röckert T. Jernberg A., Woksepp H., Sandholm K. i wsp.: Celiac disease and complement activation in response to *Streptococcus pneumoniae*. *European Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03490-w> 2019
156. Tahara S., Nojima S., Ohshima K i wsp.: Serum deprivation –response protein regulates aldehyde dehydrogenaza 1 through integrin – linked kinase signaling in endometrioid carcinoma cells. *Cancer Science* 2019; 110: 1804-1813.
157. Qing-Xuan W., En-Dong C., Ye-Feng C. i wsp.: Serum deprivation –response functions as a tumor suppressor gene in papillary thyroid cancer. *Clinical Genetics*. 2019;96: 418-428.
158. Ludvigsson J.F.:Mortality and malignancy in celiac disease. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 22 (2012) 705–722.
159. Dhanisha S.S., Guruvayoorappan C., Drishya S i wsp.: Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 122 (2018) 98–122
160. Siniewicz-Luzeńczyk K., Tkaczyk M.: Ocena częstości występowania zespołu przerostu bakteryjnego jelita cienkiego u dzieci leczonych immunosupresyjnie z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego. *Pediatr Med Rodz* 2016, 12 (2), p. 171–176.
161. Barnum S.R.: C4A: An anaphylatoxin in name only. *J Innate Immin* 2015;7:333-339.
162. Abdullah-Soheimi S.S., Boon-Kiong L., Hashim O.H. i wsp.:Patients with ovarian carcinoma excrete different altered levels of urine CD59, kininogen -1 and fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and albumin. *Proteome Science* 2010 8:58

163. Silvester J.A., Weiten D., Graff L.A. i wsp.: Is it gluten-free? Relationship between self-reported gluten-free diet adherence and knowledge of gluten content of foods. *Nutrition* 2016; 32(7-8): 777-783.
164. Furini G., Verderio E.A.M. : Spotlight on the transglutaminase 2 - heparan sulfate interaction. *Med Sci* 2019, 7,5.
165. Simula M.P., Cannizzaro R., Canzonieri V. i wsp.: PPAR signaling pathway and cancer - related proteins are involved in celiac disease -associated tissue damage. *Mol Med.* 16(5-6) 199-200, 2010.
166. Byrne G., Freeley M., Feighery C. i wsp.: Protein kinase C delta is a substrate of tissue transglutaminase and a novel autoantigen in celiac disease. *Clinical Immunology* 2013 147, 1-8.
167. Ong. T-H., Tillmaand E.G., Makurath M. i wsp.: Mass spektrometry-based characterisation of endogenous peptides and metabolomes in small volume Samales. *Biochimica et Biophysica Acta* 1854 (2015) 732-740.