

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Dorota Pawlica-Gosiewska

**Zastosowanie oznaczeń stężenia
elastazy leukocytarnej, kalprotektyny,
laktoferyny i jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe
w osoczu w różnicowaniu i ocenie aktywności klinicznej
choroby Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n med. Bogdan Solnica, Prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Diagnostyki

Katedry Biochemii Klinicznej UJ CM

Kierownik jednostki: dr hab. n med. Bogdan Solnica, Prof. UJ

Kraków, rok 2014

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
Panu prof. dr hab. Bogdanowi Solnicy
za poświęcony mi czas, cenne uwagi merytoryczne
oraz nieocenioną pomoc
w realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Serdecznie dziękuję

*Pani dr hab. **Danucie Owczarek***

*oraz Pani dr **Dorocie Cibor***

*za cenne wskazówki,
pomoc w rekrutacji pacjentów
oraz poświęcony czas.*

WYKAZ SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	11
1.1. Definicja.....	11
1.2. Epidemiologia	11
1.2.1. Różnice we współczynnikach zapadalności i chorobowości na świecie	11
1.2.2. Czynniki środowiskowe wpływające na rozwój nieswoistych zapaleń jelit	14
1.3. Patogeneza	16
1.4. Diagnostyka nieswoistych zapaleń jelit.....	24
1.4.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe.....	25
1.4.2. Badania endoskopowe z oceną histopatologiczną	25
1.4.3. Badania laboratoryjne	26
1.4.4. Problemy w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit	30
2. CEL PRACY	32
3. MATERIAŁ I METODY	33
3.1. Badane grupy	33
3.2. Metody.....	36
3.2.1. Materiał badany	36
3.2.2. Rutynowe badania laboratoryjne	36
3.2.3. Badania wykonane metodą immunoenzymatyczną ELISA.....	37
3.2.4. Badania wykonane przy użyciu immunofluorescencji pośredniej	38
3.3. Analiza statystyczna	42
4. WYNIKI.....	43
4.1. Rozkład wyników oraz ocena różnic zależnych od płci	43
4.2. Wyniki badań morfologii krwi	43
4.3. Porównanie wyników oznaczeń białek granulocytarnych, wskaźników zapalnych, I-FABP i przeciwciał w badanych grupach oraz ocena ich współzależności.....	45
4.4. Ocena użyteczności diagnostycznej ocenianych badań.....	50
4.5. Zastosowanie ocenianych badań w ocenie aktywności klinicznej nieswoistych zapaleń jelit	54
4.5.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna.....	54
4.5.2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego.....	55
4.6. Występowanie przeciwciał w badanych grupach	57
4.7. Ocena użyteczności diagnostycznej paneli przeciwciał	59

5. DYSKUSJA.....	61
6. WNIOSKI.....	72
7. STRESZCZENIE	73
8. SUMMARY	74
9. SPIS RYCIN.....	75
10. SPIS TABEL	76
11. Piśmiennictwo	78

WYKAZ SKRÓTÓW

α1AT	<i>alpha-1 antitrypsin</i>	alfa 1 antytrypsyna
ACC	<i>accuracy</i>	dokładność
ALAT	<i>alanine transaminase</i>	aminotransferaza alaninowa
ANCA	<i>antineutrophil cytoplasmic antibodies</i>	przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilii
anty-I2	<i>antibody to Pseudomonas fluorescens – associated sequence I2</i>	przeciwciała przeciwko sekwencji I2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>
APTT	<i>activated partial thromboplastin time</i>	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
ASCA	<i>anti-Saccharomyces cerevisiae autoantibodies</i>	przeciwciała przeciwko elementom ściany komórkowej grzybów <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ASPAT	<i>aspartate transaminase</i>	aminotransferaza asparaginianowa
ATG16I	<i>autophagy-related protein 16-1 gene</i>	gen <i>ATG16-1</i>
AUC	<i>area under the curve</i>	pole pod krzywą
BMI	<i>body mass index</i>	wskaźnik masy ciała
CAP18	<i>cathelicidin 18</i>	katelicydyna 18
CAP37	<i>azurocidin</i>	azurocydyna neutrofil
CD	<i>Crohn's disease</i>	choroba Leśniowskiego-Crohna
CDAI	<i>Crohn's disease activity index</i>	wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna
CRP	<i>C-reactive protein</i>	białko C-reaktywne
CUZD1	<i>proteoglycans CUB/zona pellucida-like domain-containing protein antibodies</i>	przeciwciała przeciwko glikoproteinie CUZD 1
CXC	<i>CXC chemokine</i>	chemokina z rodziny C-X-C
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	kwasy deoksyrybonukleinowe
DNBS	<i>dinitrobenzene sulfonic acid</i>	kwasy dinitrobenzenosulfonowe

DSS	<i>dextran sodium sulfate</i>	siarczan dekstranu sodu
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kwask etylenodiaminotetraoctowy
ENA-78	<i>epithelial cell-derived neutrophil activating peptide</i>	nablonkowy peptyd aktywujacy neutrofile
GAB	<i>anti globelet cells antibodies</i>	przeciwciała przeciwko komórkom kubkowym jelita
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>	śluzówkowy układ limfoidalny
GGT	<i>gamma-glutamyl transpeptidase</i>	gamma-glutamylotranspeptydaza
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GP2	<i>pancreatic zymogen granule membrane major glycoprotein antibodies</i>	przeciwciała przeciwko trzustkowej glikoproteinie 2
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>	Badanie asocjacyjne całego genomu
H₂O₂	<i>hydrogen peroxide</i>	nadtlenek wodoru
HBD-2	<i>human beta-defensin 2</i>	beta defensyna 2
HGB	<i>hemoglobin</i>	hemoglobina
HLE	<i>human leucocytes elastase</i>	elastaza leukocytarna
HTC	<i>hematocrit</i>	hematokryt
Hup-B	<i>anti histone-like protein of Mycobacterium tuberculosis antibodies</i>	przeciwciała przeciwko białku podobnemu do histonu prątka gruźlicy
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>	nieswoiste zapalenia jelit
IC	<i>indeterminate colitis</i>	nieokreślone zapalenie okrężnicy
IELs	<i>intraepithelial lymphocyte</i>	nablonkowe limfocyty cytolityczne
I-FABP	<i>intestinal fatty acid binding protein</i>	jelitowe białko wiążące wolne kwasy tłuszczowe
IL-1β	<i>Interleukin 1β</i>	interleukina 1β
iTr₃₅	<i>iTr35 cells</i>	limfocyty T regulatorowe produkujące interleukinę 35

LFS	<i>anti DNA-bound lactoferrin antibodies</i>	przeciwciała przeciwko laktoferynie związanej z DNA
LL367	<i>cathelicidin LL367</i>	katelicydyna LL367
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
LR +	<i>likelihood ratio for positive result</i>	iloraz prawdopodobieństw dla wyniku dodatniego
MUC1	<i>mucin gene 1</i>	gen mucyny 1
MUC19	<i>mucin gene 19</i>	gen mucyny 19
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>	pozakomórkowe pułapki neutrofilowe
NEU	<i>neutrophils</i>	neutrofile
NFKB	<i>nuclear factor kappa b</i>	czynnik jądrowy kappa b
NLR	<i>NOD-like receptors</i>	receptory NOD-podobne
NOD1	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 1</i>	domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy zawierająca białko 1
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2</i>	domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy zawierająca białko 2
NOD2/CARD 15	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2/caspase recruitment domaincontaining protein 15 gene</i>	gen domeny oligomeryzacyjnej wiążącej nukleotydy zawierającej białko 2 / domeny aktywacji i rekrutacji kaspaz zawierającej białko 15
NPV	<i>negative predictive value</i>	wartość predykcyjna wyniku ujemnego
nT_{reg}	<i>thymus-derived T_{reg} cells</i>	naturalne limfocyty T regulatorowe pochodzenia grasiczego
O2-	<i>superoxide radical anion</i>	anionorodnik nadtlenkowy
ClO-	<i>hypochlorite anion</i>	jon chloranowy (I)
OmpC	<i>antibodies against outer membrane porin C</i>	przeciwciała przeciwko antygenom białka kanałowego C ściany komórkowej (E. Coli)

OR	<i>odds ratio</i>	iloraz szans
PAB	<i>autoantibodies against exocrine pancreas</i>	przeciwciała przeciwko zewnątrzwydzielniczej części trzustki
PLT	<i>platelets, thrombocytes</i>	płytki krwi, trombocyty
PPV	<i>positive predictive value</i>	wartość predycyjna wyniku dodatniego
PRF	<i>pore forming protein</i>	preforyna
PSC	<i>primary sclerosing cholangitis</i>	stwardniające zapalenie dróg żółciowych
PT	<i>prothrombin time</i>	czas protrombinowy
PTGER4	<i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) gene</i>	gen receptora (podtypu) 4 prostaglandyny E
pT_{reg}, iT_{reg}	<i>periphery derived T_{reg} cells</i>	indukowane limfocyty T regulatorowe pochodzący z tkanek obwodowych
RBC	<i>red blood cells</i>	erytrocyty
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>	krzywa ROC
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktywne formy tlenu
S100A8/A9	<i>calprotectin</i>	kalprotektyna
TGF	<i>transforming Growth Factor</i>	transformujący czynnik wzrostu
Th₁	<i>T helper 1 cell</i>	limfocyt T pomocniczy 1
Th₁₇	<i>T helper 17 cell</i>	limfocyt T pomocniczy 17
Th₃	<i>T helper 3 cell</i>	limfocyt T pomocniczy 3
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>	receptor Toll-podobny 4
TNBS	<i>2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid</i>	kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>	czynnik martwicy nowotworów α
T_{reg}	<i>regulatory T cells</i>	limfocyty T regulatorowe

UC	<i>ulcerative colitis</i>	wrzodziejące zapalenie jelita grubego
WBC	<i>white blood cells</i>	leukocyty
WE-IBD	<i>European Collaborative Study on Inflammatory bowel disease</i>	Europejskie wieloośrodkowe badanie nieswoistych zapaleń jelit ośrodkami
XBP1	<i>X-box binding protein 1 gene</i>	gen białka 1 wiążącego kasetę X

1. WSTĘP

1.1. Definicja

Nieswoiste zapalenia jelit (*Inflammatory Bowel Disease – IBD*) są grupą przewlekłych schorzeń zapalnych o nieznannej etiologii zajmujących przewód pokarmowy (1). Wyróżnia się wśród nich dwie jednostki chorobowe – wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*Colitis Ulcerosa, Ulcerative Colitis - UC*) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's Disease - CD*). U około 5-15% pacjentów ze względu na niejednoznaczność objawów rozpoznaje się nieokreślone zapalenie okrężnicy (*Indeterminate Colitis – IC*) (2).

Choroba Leśniowskiego - Crohna jest pełnościennym, ziarniniakowym zapaleniem, które może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż do odbytu (3; 4). **Wrzodziejące zapalenie jelita grubego** jest rozlanym nieswoistym procesem zapalnym błony śluzowej samej odbytnicy lub odbytnicy i okrężnicy, prowadzącym w części przypadków do owrzodzeń (3; 4).

Zarówno w CD jak i UC rokowanie jest niepomyślne. U wielu chorych uzyskuje się jedynie okresową remisję. Obydwie choroby są przewlekłe i nieuleczalne, istnieje jedynie możliwość leczenia objawowego. Choroby te obniżają jakość życia pacjentów, ograniczając wykonywanie wielu codziennych czynności i aktywność zawodową, często prowadząc do przewlekłej niesprawności w sferze nie tylko fizycznej, ale także psychospołecznej.

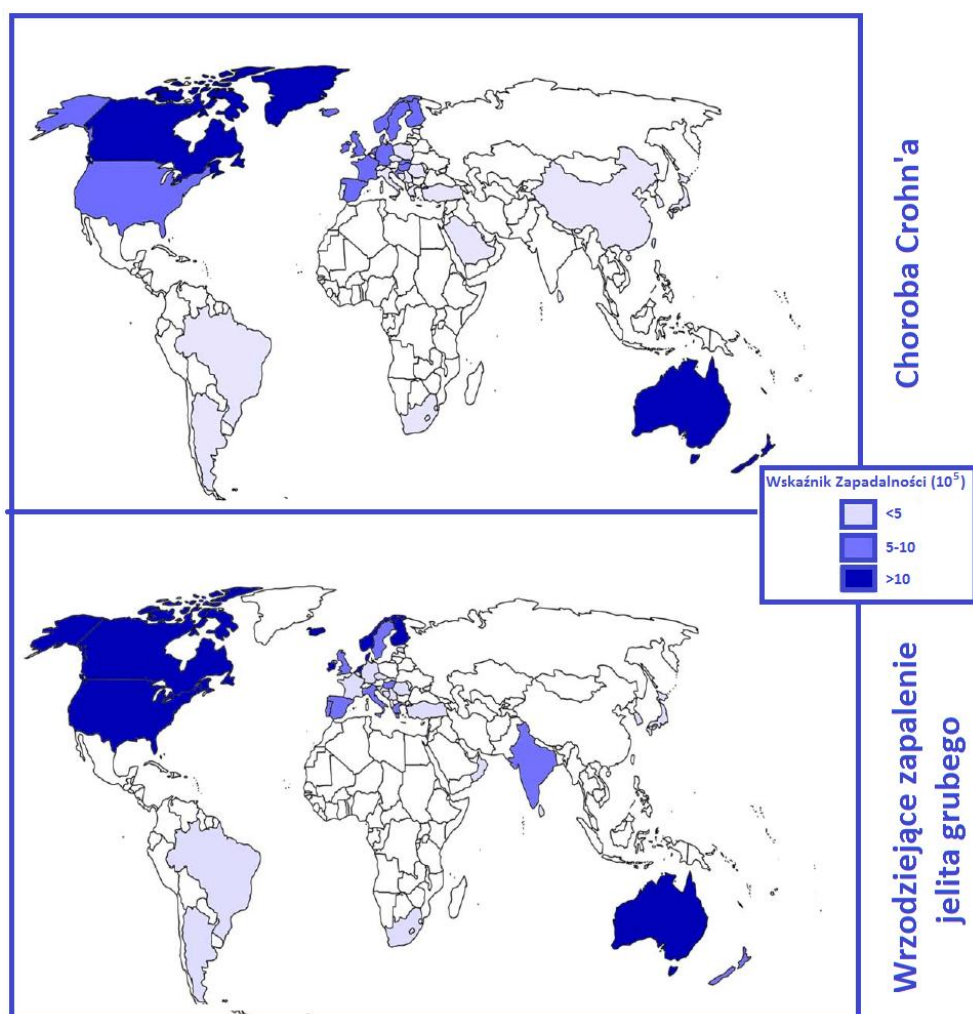
1.2. Epidemiologia

1.2.1. Różnice we współczynnikach zapadalności i chorobowości na świecie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zapadalności na IBD w różnych regionach świata (5; 6; 7; 8; 9; 10). W ciągu ostatnich 50 lat wskaźnik zapadalności na UC wprawdzie wzrósł, następnie utrzymywał się na stałym poziomie, a w niektórych rejonach zaobserwowano nawet jego spadek. W tym samym czasie obserwowano stały wzrost zapadalności na CD. Obecne dane wskazują, że w Europie zapadalność na CD wśród dorosłych utrzymuje się na stałym poziomie, a trend wzrostu jest spowodowany głównie zwiększeniem zapadalności u pacjentów pediatrycznych (6; 11). Przykładem może być zaobserwowany w latach 1988 - 2007 wzrost zapadalności na CD o 71% wśród pacjentów

między 10 a 19 rokiem życia w północnej Francji (12). Obecnie średnia zapadalność w Europie wynosi 12,7:100 000 osób dla CD oraz 24,3:100 000 osób dla UC (5).

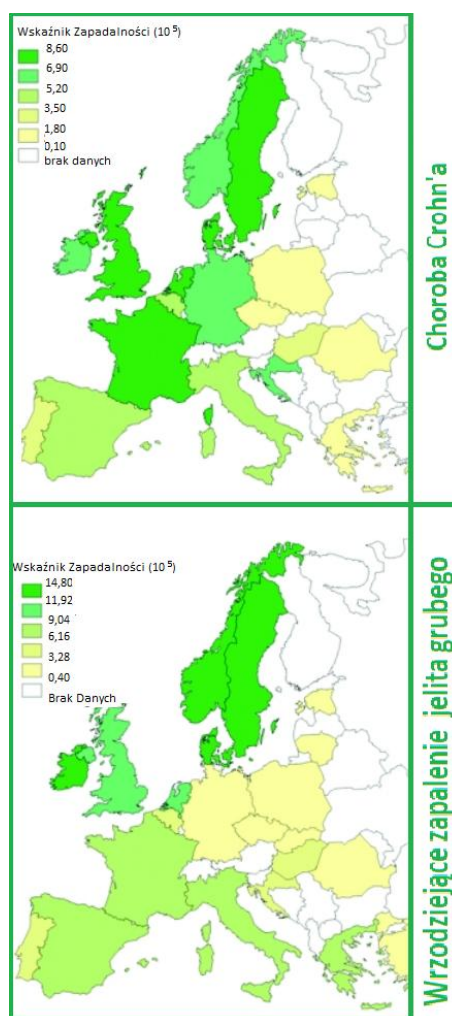
Największą zapadalność zarówno na CD jak i UC obserwuje się w północnej Europie, Wielkiej Brytanii oraz w Ameryce Północnej (9; 13). Tak wysokie wskaźniki zapadalności mogą sugerować wspólne czynniki etiologiczne na tych obszarach (6). Ponadto zaobserwowano wysoki wskaźnik zapadalności na IBD w populacji Nowej Zelandii i Australii, podobnej genetycznie do ludności północno-zachodniej Europy oraz Ameryki Północnej (Ryc. 1). Badania populacyjne przeprowadzone w Nowej Zelandii (14) oraz Australii (15) sugerują, że w tych miejscach wskaźniki zapadalności są największe na świecie.



Rycina 1. Zapadalność na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego na świecie [wg Ng i wps (6)]

W krajach rozwijających się, takich jak Chiny, Korea Południowa, Indie, Liban, Iran, Tajlandia oraz kraje północnej Afryki zachorowalność na IBD ciągle wzrasta (6).

W Europie występują wyraźne różnice pomiędzy współczynnikami z zapadalności i chorobowości na IBD zgłaszanymi przez ośrodki z różnych krajów (6). Najwyższe wskaźniki występują na wyspach Islandii, Wyspach Owczych oraz na Krecie i Sycylii (16). Te wskaźniki można wyjaśnić różnicami w typie kohorty oraz metody zbierania danych i organizacji opieki zdrowotnej. W Unii Europejskiej przeprowadzono badanie WE-IBD (*European Collaborative Study on IBD*), którego celem była ocena różnic w zapadalności i chorobowości na IBD między północną i południową Europą. Różnice te były jednak mniejsze niż można było się spodziewać, co może odzwierciedlać wzrost zachorowalności na obie choroby w Europie południowej (6).



Rycina 2. Zapadalność na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego w Europie [wg Frangos i wsp. (19)]

W Europie Wschodniej, prowadzone w ostatnich latach badania populacyjne na Węgrzech i w Chorwacji wykazały gwałtowny wzrost zapadalności i chorobowości na IBD, porównywalny ze współczynnikami w krajach Europy Zachodniej (6; 16; 17). Za jedną z

możliwych przyczyn wzrostu tych wskaźników przyjmuje się wpływ czynników środowiska. W ciągu dwóch ostatnich dekad zaobserwowano zmiany w stylu życia mieszkańców Europy Wschodniej, co jest rezultatem przejmowania wzorców kulturowych z Europy Zachodniej i Stanów Zjednoczonych (18).

Oprócz różnic w zachorowalności i chorobowości pomiędzy krajami i regionami, stosunek tych wskaźników dla UC i CD wykazuje również zmienność geograficzną. W odróżnieniu od reszty Europy (16; 17; 19), wyższy wskaźnik zachorowalności na UC niż na CD odnotowano w krajach skandynawskich (20; 21). Powody tego nie są całkowicie jasne. Wydaje się, że różnice w stosunku zapadalności na UC i CD między krajami i regionami mogą odzwierciedlać różnice w czynnikach środowiska oraz predyspozycjach genetycznych populacji. Wykazano, że w Europie częstość mutacji genu *NOD2/CARD15* jest największa w środkowej części kontynentu, co odpowiada regionom, w których zapadalność na CD jest większa niż na UC (22). W niektórych krajach Europy wschodniej stosunek zapadalności na UC do CD jest bliski 1: 1, a nawet większy, jak na przykład w Chorwacji (23; 24).

Dane epidemiologiczne z Polski i Rumunii w przeciwieństwie do krajów Europy Wschodniej wskazują na małą zapadalność i chorobowość na IBD (6). Według danych z początku 2014. zebranych z 92 ośrodków w ramach Krajowego Rejestru, w Polsce zarejestrowano 5191 chorych na CD (www.chorobacrohna.pl). Brakuje danych epidemiologicznych na temat liczebności pacjentów z UC w Polsce (2). W 2005. opublikowano badanie Wiercinskiej-Drapalo i wsp. (25) 248 chorych na IBD (233 na UC i 15 na CD), hospitalizowanych w latach 1990-2003 w Oddziale Chorób Zakaźnych Szpitala w Białymstoku. Autorzy ci zaobserwowali, że występowanie UC w północno-wschodniej Polsce jest znacznie częstsze niż CD. Większość przypadków UC rozpoznano w młodszych grupach wiekowych (20-40 lat), z dominacją mężczyzn. Najczęstszą kliniczną postacią UC pozostaje lewostronne zapalenie jelita grubego (25).

1.2.2. Czynniki środowiskowe wpływające na rozwój nieswoistych zapaleń jelit

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują, że na wzrost zapadalności na IBD w krajach rozwijających się, w których dokonał się rozwój gospodarczy i społeczny, mają wpływ czynniki środowiskowe. Dwa najlepiej potwierdzone czynniki ryzyka rozwoju IBD to palenie papierosów oraz przebycie operacji usunięcia wyrostka robaczkowego (6). Raporty z krajów wysoko rozwiniętych konsekwentnie wskazują palenie papierosów, jako

czynnik ryzyka zachorowania na CD (26; 27). W większości badań iloraz szans (OR) dla rozwoju CD u osób palących mieści się w zakresie 1,5-2,0 (6). Do tej pory nie znaleziono odpowiedzi na pytanie, dlaczego ilość osób palących papierosy, która różni się w grupach etnicznych i rejonach geograficznych, nie przekłada się bezpośrednio na liczbę osób chorych na IBD (27; 28) oraz dlaczego zaobserwowano znikomy wpływ palenia papierosów na rozwój IBD wśród Żydów i Azjatów w porównaniu z populacją kaukaską (29; 30). Badacze doszukują się wyjaśnienia w różnicach w czynnikach genetycznych i/lub środowiskowych (np. rodzaj tytoniu, sposób palenia tytoniu lub czynniki dietetyczne) (6). Z tych powodów wydaje się, że palenie papierosów może odgrywać rolę w modulowaniu choroby (6). Przeprowadzono kilkanaście badań, w których stwierdzono, że aktywni palacze częściej mają bardziej agresywną postać CD lub częściej przechodzą zaostrzenie po operacji (31). Ponadto wykazano, że w populacji kaukaskiej palenie ma przeciwstawny wpływ na występowanie UC (OR 0,58) i CD (OR 1,76) (26). Co ciekawe, zaobserwowano wzrost ryzyka zachorowania na UC w ciągu 3 lat od zaprzestania palenia (32).

W ciągu ostatnich 15 lat wyraźnie spadła liczba usunięć wyrostka robaczkowego, czego nie da się przełożyć na stałą lub wzrastającą częstość zachorowania na UC w krajach rozwijających się (6). W kliniczno-kontrolnych i kohortowych badaniach w Europie oraz regionie Azji i Pacyfiku wykazano, że usunięcie wyrostka robaczkowego jest czynnikiem protekcyjnym dla rozwoju UC (33; 34). Mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony. Podejrzuje się, że zmiany w śluzówkowym systemie odpornościowym prowadzące do zapalenia wyrostka robaczkowego lub będące wynikiem jego usunięcia wpływają na mechanizmy patogenetyczne w UC (35). Ponadto jednym z zadań wyrostka robaczkowego może być funkcja dodatkowego rezerwuaru mikroflory jelitowej oraz regulowanie odpowiedzi immunologicznej na antygeny bakteryjne (36). W przypadku CD, zabieg usunięcia wyrostka robaczkowego nie wpływa na wzrost lub zmniejszenie ryzyka zachorowania (32).

Kolejnym czynnikiem, który można przedysponować do zachorowania na IBD jest wpływ diety. Zmiana nawyków żywieniowych prawdopodobnie może wyjaśnić różnice w ryzyku zachorowania na IBD między regionami geograficznymi i wzrost częstości występowania choroby w takich krajach jak Wielka Brytania, w której nastąpił wzrost imigracji w ostatnich latach. Zapadalność wśród Brytyjczyków pochodzenia europejskiego wynosi 7/100 000, natomiast wśród Brytyjczyków pochodzenia azjatyckiego aż 17/100 000 (6). Wpływowi diety na ryzyko i przebieg kliniczny IBD nie poświęcono tyle uwagi, jak

wydarze się być to uzasadnione. Badania prospektywne wskazują, że dieta bogata w białko, szczególnie pochodzenia zwierzęcego, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia IBD. Ponadto wykazano, że dostarczanie w diecie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-6 powoduje wzrost ryzyka zapadalności na UC, natomiast wielonienasycone kwasy n-3 mogą działać protekcyjnie (37).

Jedną z prób wyjaśnienia zmienności geograficznej występowania IBD jest ocena częstości choroby oraz czynników takich jak ekspozycja na słońce, gleba, klimat, zmiany temperatury i zanieczyszczenia powietrza (38). Badania przeprowadzone w Europie wskazują, że w obszarach o małej ekspozycji na światło słoneczne może ona mieć wpływ na rozwój IBD. Postawiono hipotezę, że u ludzi bardziej eksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe wytwarzana w większej ilości witamina D uczestniczy w regulacji odporności i stanu zapalnego. W prospektywnym badaniu populacji 175 000 kobiet stwierdzono zmniejszone ryzyko zachorowania na CD u kobiet zamieszkujących południowe, bardziej nasłonecznione tereny w porównaniu z kobietami zamieszkującymi północne rejony Stanów Zjednoczonych (39). Pojawiły się także doniesienia o ochronnym działaniu witaminy D na ryzyko zachorowania na CD. Kobiety z większym stężeniem witaminy D miały znacznie zmniejszone ryzyko CD (ryzyko względne, HR=0,38) (40).

Stwierdzono, że czynnikiem predysponującym zachorowanie na IBD mogą być zbyt wysokie standardy higieny w wieku niemowlęcym i w dzieciństwie. Hipoteza ta zakłada, że brak kontaktu z antygenami bakteryjnymi upośledza kształtowanie się odpowiedzi immunologicznej organizmu, co może prowadzić do zwiększonej zapadalności na choroby atopowe jak astma oraz nieswoiste zapalenia jelit (32). Kilka badań przeprowadzonych w USA i Wielkiej Brytanii z udziałem ponad 80 000 kobiet wykazało zwiększone ryzyko CD w następstwie stosowania doustnej antykoncepcji (6). Ponadto, wyniki tych badań sugerowały, że ryzyko zachorowania na CD zwiększało się wraz z czasem stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych (41).

1.3. Patogeneza

Etiopatogeneza IBD nie została w pełni wyjaśniona, wiadomo, że jest wieloczynnikowa (1; 3; 42; 43). Ostatnio prezentowana teoria zakłada, że u podstaw rozwoju IBD leży nieprawidłowa odpowiedź śluzówkowego układu limfoidalnego GALT (*gut-*

associated lymphoid tissue) na komensalną florę jelitową oraz udział receptora TLR4 znajdującego się w połączeniach ścisłych komórek błony śluzowej, prowadzący do „rozszerzenia” błony śluzowej, napływu komórek zapalnych oraz odsłonięcia miejsc antygenowych, co powoduje przewlekłe zapalenie przewodu pokarmowego u osób predysponowanych genetycznie (44; 45; 46; 47).

Złożona patogenezą obejmuje oddziaływanie takich czynników jak predyspozycje genetyczne, które mogą prowadzić do zaburzeń czynności komórek układu immunologicznego, upośledzać funkcje bariery błony śluzowej jelit oraz zwiększać podatność na działanie czynników środowiska, w tym mikroflory jelitowej. Interakcje pomiędzy powyższymi czynnikami przyczyniają się do różnorodnego przebiegu klinicznego IBD oraz zróżnicowanej odpowiedzi na leczenie (48; 49)

IBD stanowią heterogenną grupę przewlekłych chorób zapalnych mających często swój początek w dzieciństwie pomimo, że tylko u 20-25 % osób chorujących od dziecka rozpoznawane są w tym okresie (50; 51; 52). Już ponad 70 lat temu przeprowadzono badania na bliźniakach monozygotycznych, u których rozpoznano IBD. Było to pierwsze doniesienie wskazujące na podłoże genetyczne IBD (53). Badanie *German Nationwide Study 2* (54) potwierdziło silniejszy wpływ czynników genetycznych na rozwój CD niż UC. Wykazało, że 35% monozygotycznych bliźniąt, a tylko 3% heterozygotycznych rodzeństw chorowało na CD, natomiast UC rozpoznano jedynie u 16 % bliźniąt jednojajowych. Ponadto, w przypadku zachorowania jednego z bliźniąt monozygotycznych obserwowano większe ryzyko zachorowania na IBD bliźniaka urodzonego wcześniej (70% w przypadku CD oraz 81% w przypadku UC) (54). Rodzinne podłoże występowania IBD zostało potwierdzone również w innych pracach (53; 55). Ponadto stwierdzono większą chorobowość u Żydów aszkenazyjskich niż wśród innych grup etnicznych. Pochodzenie żydowskie jest niezależnym czynnikiem ryzyka IBD (53).

Badanie GWAS (*Genome Wide Association Studies*) (56) zidentyfikowało i potwierdziło 71 wariantów różnych genów na 17 chromosomach związanych z występowaniem CD. Badanie zwiększyło około dwukrotnie liczbę znanych genów związanych z podatnością na CD. Chociaż wykryte allele tylko nieznacznie wpływają na ryzyko wystąpienia choroby, pomogły w lepszym zrozumieniu genetycznej etiologii CD (56). Mutacje obu alleli genu *NOD2/CARD15* położonego na chromosomie 16 zwiększają 20-40 krotnie ryzyko zachorowania na CD, a także warunkują wcześniejszy początek choroby (4; 57). Ekspresja genu *NOD2* jest duża w monocytach oraz w komórkach śluzówki jelita

cienkiego i grubego. Białko będące produktem genów *NOD1* i *NOD2* bierze udział w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej bakterii: lipopolisacharydu (LPS) i peptydoglikanów (57). Brak zdolności rozpoznawania bakterii upośledza odpowiedź immunologiczną i może powodować rozchwianie systemu odpornościowego. Zaburzenia odpowiedzi przeciwbakteryjnej w CD dodatkowo potwierdza znamieny spadek ekspresji peptydów o działaniu przeciwbakteryjnym, takich jak: α -defensyny, β -defensyny HBD-2 i katelicyny LL367 (58).

W IBD dochodzi do zmian flory bakteryjnej przewodu pokarmowego, ze znacznym zwiększeniem udziału drobnoustrojów patogennych, w tym szczepów o zwiększonej adhezji i wirulencji, co jest szczególnie widoczne u chorych z CD. Wśród potencjalnych czynników etiopatogenetycznych CD wymienia się m.in. wirusa odry, drobnoustroje z rodzajów *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes* czy inwazyjne, przylegające szczepy *Escherichia coli*. Najnowsze badania skupiają się na roli patogennej prątka *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, który u przeżuwaczy powoduje ziarniniakowe zapalenie jelit, podobne pod względem histologicznym do CD u ludzi (43).

Fizjologicznie w jelicie śluzówkowy system odpornościowy (GALT) może zwiększać reakcję przeciwbakteryjną z tolerancją na antygeny pochodzące z pokarmu lub bakterii jelitowych. Pierwszą linią obrony GALT jest spolaryzowana pojedyncza warstwa komórek nabłonkowych pokrytych biofilmem śluzu wydzielanego przez komórki kubkowe, zawierającego bakterie komensalne (59). Zwiększona ekspresja genu mucyny *MUC1* u pacjentów z CD obejmującą jelito kręte sugeruje, że warstwa biofilmu staje się niewystarczająca (53). Hipotezę tą potwierdzają wyniki badania GWAS, które wskazują na związek występowania mutacji w genach *MUC1*, *MUC19* i *PTGER4* (kodującego receptor prostaglandyny E) z CD (55). Pod warstwą biofilmu znajduje się bariera śluzówkowa, złożona z komórek nabłonka jelitowego. Połączenia ścisłe (*tight junctions*) między sąsiadującymi komórkami nabłonka uniemożliwiają swobodny przepływ między światłem jelita i jego ścianą, w tym wnikanie w nią mikroorganizmów. W IBD obserwuje się rozszczelnienie połączeń między komórkami błony śluzowej, być może spowodowane zmianą ekspresji białek połączeń ścisłych, takich jak kładyny (60; 61). Odsłania to antygeny znajdujące się w blaszce właściwej oraz powoduje napływ komórek układu odpornościowego. Wyniki badań *in vitro* i na modelach zwierzęcych (62; 63; 64) wiążą zmiany w białkach połączeń ścisłych ze zwiększeniem przepuszczalności połączeń komórek nabłonkowych

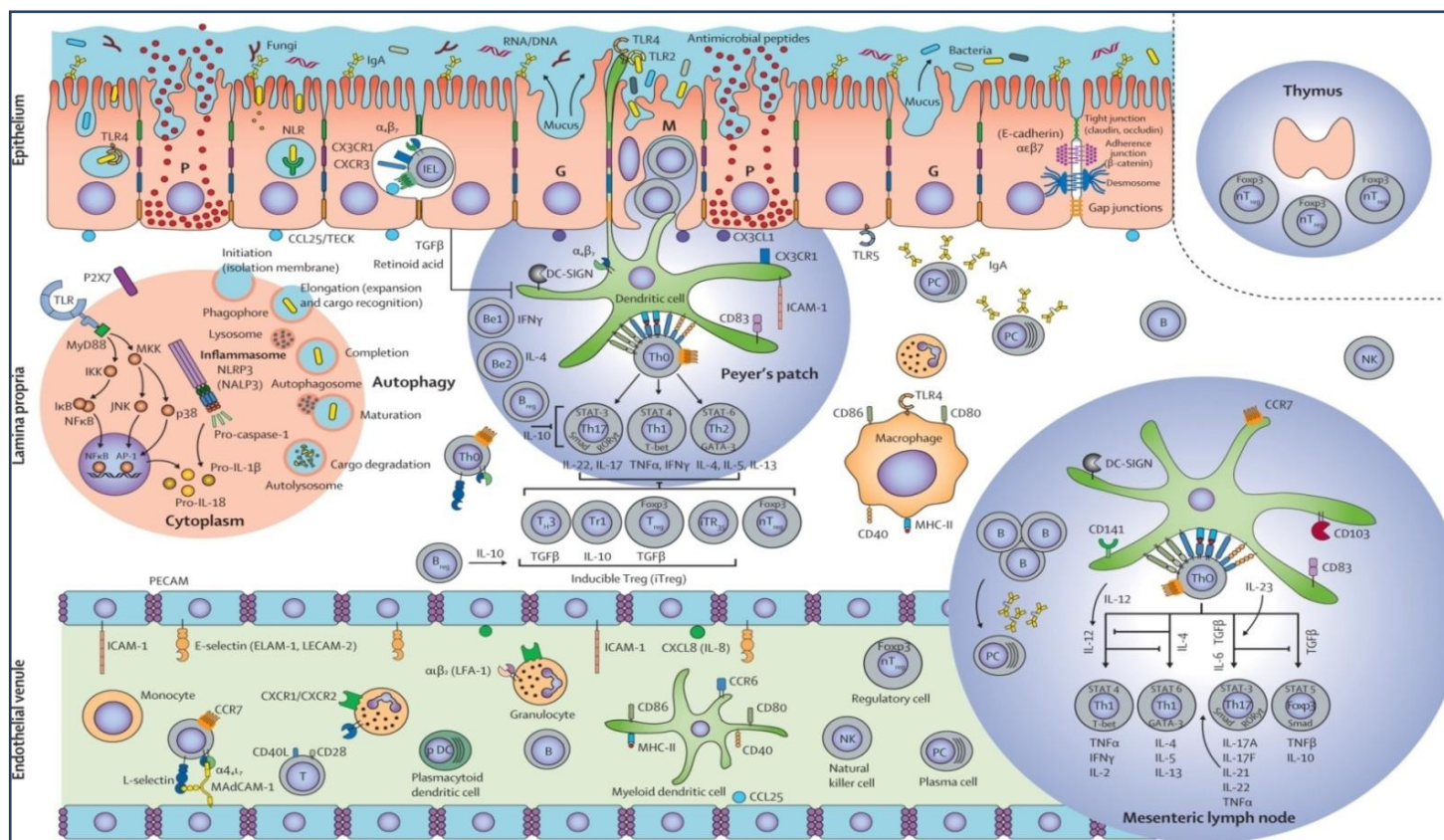
jelita. Pośredniczy w tym kinaza łańcucha lekkiego miozyny (53; 62) oraz aktywowane limfocyty T i cytokiny charakterystyczne dla CD, takie jak czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) (62; 65) i interferon γ , które wraz ze zmianami mikroflory jelita stwierdzono u pacjentów z mutacją *NOD2/CARD15* (65). Ostatnie doniesienia wskazują również na defekt przepuszczalności ściany jelita u krewnych pierwszego stopnia osób z rozpoznaną CD, u których stwierdzono mutacje *NOD2/CARD15* (56; 66).

Komórki Panetha, wysoko wyspecjalizowane komórki nabłonka, których funkcją jest obrona bariery śluzówki jelita poprzez wydzielanie pęcherzyków zawierających białka przeciwbakteryjne, takie jak defensyny, biorą także udział w regulacji biofilmu mikroflory jelitowej (67). Stwierdzono, że u pacjentów z CD, u których wykryto w genie *ATG16I* kodującym białko biorące udział w procesie autofagii, substytucję w miejscu aminokwasowym 300 T→A, komórki Panetha produkują mniej pęcherzyków, często dysmorficznych oraz o upośledzonej funkcji w porównaniu z osobami, u których wykryto inne mutacje (68). Dodatkowo, powiązано zaburzenia w funkcji komórek Panetha z zapaleniem obejmującym jelito kręte oraz polimorfizmami w genach *XBPI* i *NOD2/CARD15* w modelu zwierzęcym (69; 70). Stres siateczki endoplazmatycznej w bardzo aktywnych komórkach jelita oraz komórkach Panetha może zaburzać odpowiedź tych komórek oraz indukować stan zapalny. Hipomorficzna mutacja genu *XBPI* (związanego z CD) z delecją w jednym allelu zwiększa zapalenie ściany jelita, a delecja w obu allelach powoduje apoptozę komórek Panetha oraz zwiększa dysfunkcję komórek kubkowych. Związane jest to z samoistnym zapaleniem jelita wywoływanym w szlaku, który obejmuje aktywację IRE1 JNK oraz NF κ B, a co za tym idzie, zapalną kaskadę sygnałową (71).

Komórki odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, pochodzące z nabłonka oraz blaszki właściwej ściany jelita, rozpoznają poprzez receptory TLR (*toll like receptor*) lub NLR (*NOD-like receptor*) antygeny mikroflory jelitowej, takie jak lipopolisacharyd (LPS), składniki peptydoglikanu, kwas lipotejchowy, jedno i dwuniciowy RNA, niemetylowane fragmenty DNA bakterii oraz składniki diety. Najwięcej antygenów bakteryjnych przechwytyują komórki dendrytyczne zakotwiczone w blaszce właściwej, wypuszczające do światła jelita wypustki (dendryty), które pochłaniają antygeny. Następnie poprzez odpowiednie sygnały sterują one zachowaniem innych komórki układu odpornościowego w kierunku odpowiedzi immunologicznej lub tolerancji (72). Rozmieszczenie (73) oraz fenotyp (73; 74) komórek dendrytycznych są związane z aktywnością kliniczną CD (75), zwiększoną ekspresją genu *TLR 2* (76) oraz *TLR 4* (74), a także ze zwiększoną odpowiedzią na

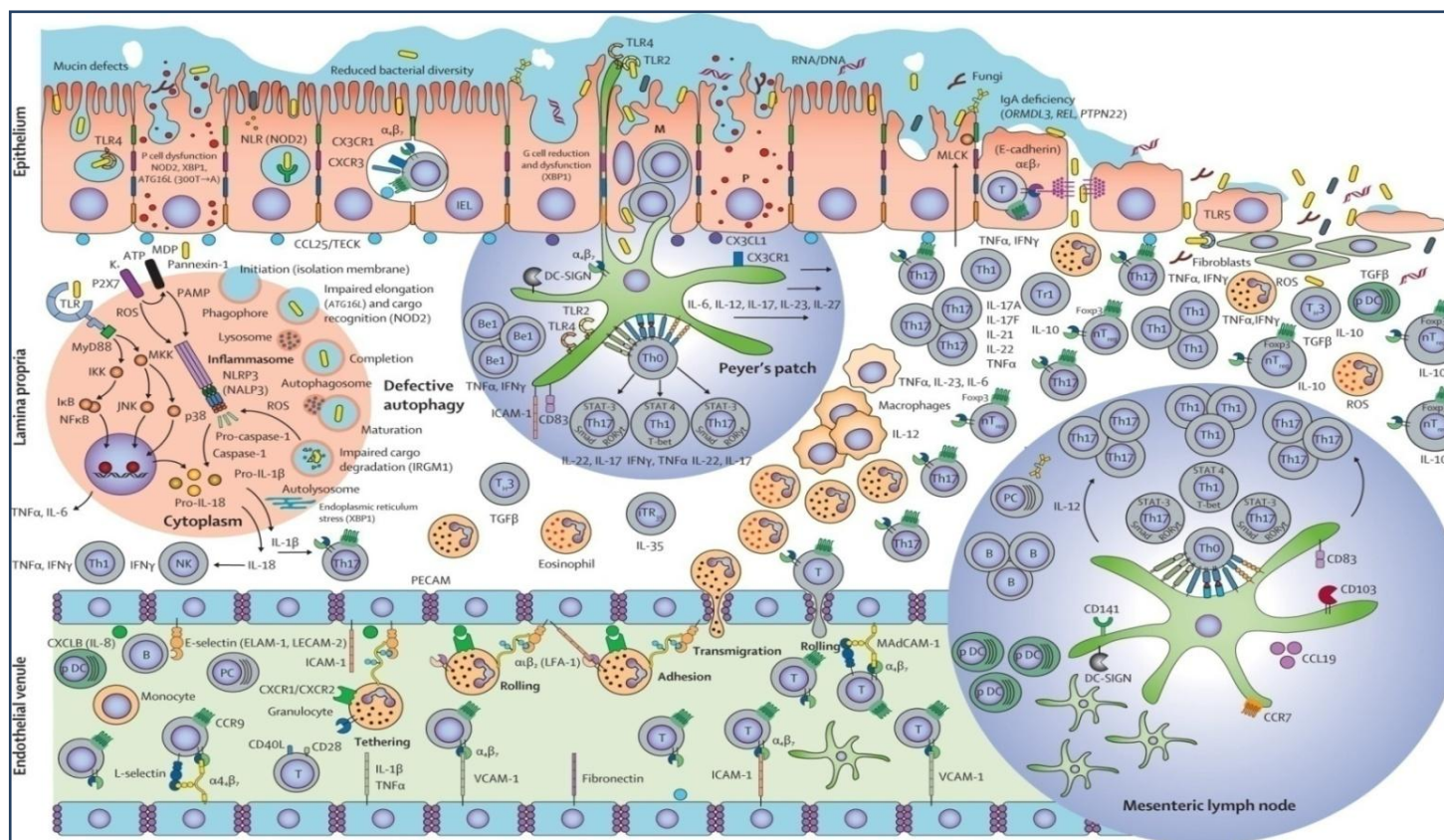
lipopolisacharyd (74). Na modelu zwierzęcym obserwowano funkcje receptora TLR i stwierdzono, że bakterie komensalne poprzez indukcję sygnału TLR zapobiegają procesowi zapalnemu w jelitach (77). Zdolność komórek dendrytycznych do indukowania tolerancji immunologicznej komórek T regulatorowych (T_{reg}), może zostać u pacjentów z CD utracona (78). Receptory cytozolowe NLR są kolejną ważną grupą białek rozpoznających antygeny, w ich skład wchodzi między innymi NOD1 i NOD2. Eksperymentalne dowody łączą polimorfizm genu *NOD2/CARD15* (związanego z CD) z osłabioną reakcją zapalną na dipeptyd muramyłowy (79) i nieefektywną autofagię (80). IBD charakteryzuje się zaburzeniem równowagi pomiędzy limfocytami T efektorowymi (głównie limfocyty Th1 lub limfocyty Th17 broniące błonę śluzową przed bakteriami, grzybami i wirusami poprzez wydzielanie interferonu γ , TNF α i interleukiny 17 oraz 22), a limfocytami T regulatorowymi wydzielającymi interleukinę 10, transformujący czynnik wzrostu [TGF] β i interleukinę 35 (81), pochodzącymi z grasicy (*thymus-derived T_{reg} cells* - n T_{reg}) i pochodzenia obwodowego (*periphery derived T_{reg} cells* – p T_{reg} , iTreg), takich jak Tr1, Th3 i iTreg35 w błonie śluzowej (82). Wykazano, że istotną rolę odgrywa odpowiedź immunologiczna z udziałem limfocytów Th1 produkujących cytokiny, między innymi interferon γ i TNF α (48; 83; 84). Ponadto, poszczególne homozygotyczne mutacje genu receptora IL 10 mogą zakłócać ściśle regulowaną równowagę cytokin produkowanych przez limfocyty T i przyczyniać się do wczesnego początku CD (85). Zniszczenie błony śluzowej jelita jest związane ze zwiększoną liczbą efektorowych komórek układu limfatycznego, takich jak aktywowane limfocyty T CD4+, CD8+ i cytotoksyczne, nabłonkowe limfocyty cytolityczne (IELs) oraz limfocyty T zawierające PRF (*pore forming protein*) i granzymy. Odpowiedź immunologiczna jest zainicjowana, kiedy cytotoksyczne limfocyty CD8+ lub pomocnicze CD4+ w świetle jelita rozpoznają antygeny (86). Manifestuje się to ostatecznie zwiększonym stężeniem immunoglobulin IgG1 i IgG3 w UC i IgG1 i IgG2 w CD (87). Jednym z przejawów zaburzeń immunologicznych są reakcje krzyżowe z czynnikami środowiska, w tym z mikroflorą jelitową i w ich konsekwencji produkcja przeciwciał przeciw *Saccharomyces cerevisiae* u chorych na CD oraz autoprzeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilii u pacjentów z UC (88; 89).

Różnice w prawidłowo i nieprawidłowo działającym śluzówkowym układzie odpornościowym jelita przedstawiono na Ryc. 3 i 4.



Rycina 3. Prawidłowo działający Jelitowy układ odpornościowy [Baumgart i wsp (53)]

AP-1 - czynnik transkrypcyjny AP-1; **B** - limfocyt B; **Be** - plazmocyty; **Breg** - komórka regulatorowa B; **CD** - antygen różnicowania komórkowego; **CCL** - ligand dla chemokiny typu C-C; **CCR** - receptor dla chemokiny typu C-C; **CXCL** - ligand dla chemokiny typu C-X-C; **CXCR** - receptor dla chemokiny typu C-X-C; **DC-SIGN** - swoista dla komórek dendrytycznych nieintegryna wychwytyująca cząsteczkę adhezji międzykomórkowej 3; **ELAM** - śródnałonkowa molekula adhezyjna limfocytów; **FoxP3** - czynnik transkrypcyjny FoxP3; **G** - komórki kubkowe jelita; **GATA** - białko wiążące GATA; **ICAM** - międzykomórkowa molekula adhezyjna; **IFN** - interferon; **Ig** - immunoglobulina; **IL** - interleukina; **IEL** - limfocyty śródnałonkowe; **JNK** - kinaza JNK; **IKK** - kinaza IκB; **LECAM1** - lektynowa molekula adhezyjna-1; **LFA** - antygen funkcji limfocytów; **M** - komórka M; **MadCAM** - cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych; **MKK** - kinaza kinaz aktywowanych mitogenem; **MyD88** - mieloidalny czynnik różnicowania 88; **NKκB** - czynnik transkrypcyjny κ B; **NK** - komórka NK; **NLR** - receptor NOD-podobny; **NLRP** - podtyp receptora NOD-podobnego zawierający N-kończącą domenę PYD; **P2XR** - receptor P2X; **p38** - Kinaza białka p38 aktywowana przez mitogen; **P** - komórka Panetha; **PECAM** - molekula adhezji płytkowo-śródnałonkowej; **pDC** - plazmacytoidalne komórki dendrytyczne; **RORγ** - receptor jądrowy RORγ; **Smad** - białka z rodziny SMAD; **STAT** - białko STAT, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji; **T** - limfocyt T; **nT_{reg}** - naturalny limfocyt T regulatorowy, pochodzenia grasiczego; **iT_{reg}** - indukowane limfocyty T regulatorowe, pochodzący z tkanek obwodowych; **iTR35** - limfocytów T regulatorowych produkujące interleukinę 35; **Tr** - limfocyty T regulatorowe; **T-bet** = Czynnik transkrypcyjny *T-bet*; **TECK** - chemokina typu C-C 25; **TGFβ** - Transformujący czynnik wzrostu β; **Th** - limfocyt T pomocniczy; **TNFα** - czynnik martwicy nowotwora α; **TLR** - receptor Toll-podobny



Rycina 4 Dysfunkcja jelitowego układu odpornościowego w nieswoistych zapaleniach jelit [Baumgart i wsp (53)]

AP-1 - czynnik transkrypcyjny AP-1; **B** - limfocyt B; **Be** - plazmocyty; **Breg** - komórka regulatorowa B; **CD** - antygen różnicowania komórkowego; **CCL** - ligand dla chemokiny typu C-C; **CCR** - receptor dla chemokiny typu C-C; **CXCL** - ligand dla chemokiny typu C-X-C; **CXCR** - receptor dla chemokiny typu C-X-C; **DC-SIGN** - swoista dla komórek dendrytycznych nieintegracyjna wychwytyjąca cząsteczkę adhezji międzykomórkowej 3; **ELAM** - śródnabłonkowa molekula adhezji limfocytów; **FoxP3** - czynnik transkrypcyjny FoxP3; **G** - komórki kubkowe jelita; **GATA** - białko wiążące GATA; **ICAM** - międzykomórkowa molekula adhezji; **IFN** - interferon; **Ig** - immunoglobulina; **IL** - interleukina; **IEL** - limfocyty śródnabłonkowe; **JNK** - kinaza JNK; **KK** - kinaza IκB; **LECAM1** - lektynowa molekula adhezji-1; **LFA** - antygen funkcji limfocytów; **M** - komórka M; **MadCAM** - cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych; **MKK** - kinaza kinaz aktywowanych mitogenem; **MyD88** - mieloidalny czynnik różnicowania 88; **NKκB** - czynnik transkrypcyjny κ B; **NK** - komórka NK; **NLR** - receptor NOD-podobny; **NLRP** - podtyp receptora NOD-podobny zbudowany z N-końcowej domeny PYD; **P2XR** - receptor P2X; **p38** - Kinaza białka p38 aktywowana przez miogen; **P** - komórka Panetha; **PECAM** - molekula adhezji płytkowo-śródnabłonkowej; **pDC** - plazmocytoidalne komórki dendrytyczne; **RORγ** - receptorów jądrowych RORγ; **Smad** - białka z rodziny SMAD; **STAT** - białko STAT, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcyjny; **T** - limfocyt T; **nTreg** - naturalny limfocyt T regulatorowy, pochodzenia grasiczego; **iTreg** - indukowane limfocyt T regulatorowy, pochodzący z tkanek obwodowych; **iTR35** - limfocytów T regulatorowych produkujące interleukinę 35; **Tr** - limfocyty T regulatorowe; **T-bet** - Czynnik transkrypcyjny *T-bet*; **TECK** - chemokina typu C-C 25; **TGFβ** - Transformujący czynnik wzrostu β; **Th** - limfocyt T pomocniczy; **TNFα** - czynnik martwicy nowotwora α; **TLR** - receptor Toll-podobny

Neutrofile są komórkami uczestniczącymi w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu, biorą udział w obronie przed patogenami, minimalizując jednocześnie szkodliwe efekty działania komórek uszkodzonych lub w stanie nekrozy (90). Komórki te dysponują dużym arsenalem związków o działaniu przeciwbakteryjnym. Jednym z mechanizmów niszczenia patogenów jest fagocytoza. Po połączeniu fagosomu z lizosomem patogen podlega działaniu związków zależnych od tlenu (reaktywne formy tlenu [RFT], produkowane przy udziale oksydazy NADPH, takie jak nadtlenek wodoru [H₂O₂], podchloryn [ClO⁻] i anionorodnik ponadtlenkowy [O²⁻]) oraz mechanizmów niezależnych od tlenu – degranulacja wewnątrzkomórkowa uwalniająca zawartość ziarnistości azurofilnych. Innym mechanizmem jest degranulacja zewnątrzkomórkowa - wydzielanie ziarnistości do przestrzeni pozakomórkowej. Wreszcie, neutrofile posiadają zdolność do wytwarzania tzw. pułapek pozakomórkowych (*neutrophil extracellular traps, NET*). Rolą NET jest unieruchomienie i zniszczenie patogenów (91; 92; 93).

Doniesienia na temat udziału neutrofilii w patogenezie IBD są niejednoznaczne. Niektóre badania opisują korzystny wpływ, a inne – czynny udział neutrofilii w patogenezie IBD. Na przykład, wyniki niektórych badań z zastosowaniem zwierzęcego modelu zapalenia okrężnicy indukowanego przy użyciu kwasu dinitrobenzenosulfonowego (DNBS), siarczanu dekstranu sodu (DSS) i limfocytów CD4 + o fenotypie CD45RB wykazały, że niedobór neutrofilii zaostrza stan zapalny, co sugeruje, że neutrofile odgrywają korzystną rolę w zapaleniu jelita grubego (94; 95). W przeciwieństwie do tego, wykazano łagodzenie objawów zapalenia okrężnicy, indukowanego u szczurów przez siarczan dekstranu sodu (DSS) oraz kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy (TNBS), poprzez zmniejszenie liczby neutrofilii stosując przeciwciała przeciwneutrofilowe (96; 97). Analizując wyniki takich badań należy pamiętać, że udział neutrofilii w regulowaniu zapalenia jelit zależy od warunków i zastosowanego przez badaczy modelu. Dla lepszego zrozumienia udziału neutrofilii w patomechanizmie IBD potrzebne są dalsze badania (98).

Za udziałem neutrofilii w patogenezie IBD przemawia ich obecność w zapalnie zmienionej ścianie jelita zarówno u chorych z CD, jak i z UC. Rekrutacja neutrofilii w IBD zachodzi pod wpływem wydzielanych przez monocyty chemokin. Neutrofile obecne we krwi w odpowiedzi na chemokiny przechodzą przez śródbłonek naczyń, aby dotrzeć do blaszki właściwej ściany jelit. Jako część normalnej reakcji zapalnej jelit, neutrofile są rekrutowane do miejsc infekcji lub stanu zapalnego w ciągu kilku minut, a szczyt odpowiedzi następuje w ciągu 24 - 48 godzin. W pewnych warunkach fizjologicznych lub patologicznych,

neutrofile przekraczają nabłonek i dostają się do światła jelit, a następnie selektywnie uwalniają czynniki chemotaktyczne dla monocytów, jak katelicydyna 18 (CAP18), katepsyny G i azurocydyna neutrofilii (CAP37). Dlatego w ciągu następnych dni, jako druga fala komórek odpowiedzi zapalnej w świetle jelita pojawiają się makrofagi (99).

Istnieją też dane wskazujące na związek nieprawidłowej funkcji neutrofilii z patogenezą IBD. Na przykład, u osób z CD generowanie nadtlenu wodoru w neutrofilach i fagocytoza mogą być upośledzone (100; 101). Ponadto, dysfunkcja neutrofilii obserwowana w CD wydaje się być powiązana z wadą w odpowiedzi makrofagów. Badania *in vitro* i *in vivo*, z użyciem makrofagów od pacjentów z CD wykazały spadek produkcji cytokin prozapalnych w porównaniu do prawidłowych komórek (98). Wykazano też, że migracja neutrofilii u pacjentów z CD przy urazie skóry i jelit jest mniejsza niż u osób zdrowych, prawdopodobnie ze względu na zmniejszoną produkcję chemoatraktantów przez makrofagi (102).

U pacjentów z IBD obserwuje się opóźnienie apoptozy neutrofilii. Apoptotyczne neutrofile, które nie są usuwane przez makrofagi i ulegają wtórnej nekrozie, uwalniają zawartość wewnątrzkomórkowych ziarnistości, co może prowadzić do uszkodzenia tkanek (98). Przypuszcza się, że opóźnienie apoptozy obserwowane w okrężnicy jest wtórne do obfitego uwalniania antyapoptotycznych cytokin, takich jak GM-CSF oraz spadku ekspresji kaspazy. U pacjentów z UC zaobserwowano opóźnienie apoptozy neutrofilii obecnych w płynach po perfuzji jelit, zależne od GM-CSF oraz zwiększenie migracji neutrofilii *in vitro* (103).

Neutrofile, jako komórki z definicji uczestniczące w procesie zapalnym są zaangażowane w zjawiska składające się na patogenezę IBD, o czym świadczą zarówno wyniki badań eksperymentalnych, jak i histopatologicznych (98). W świetle innych danych, udział neutrofilii w patogenezie IBD należy rozpatrywać również w kontekście zaburzeń ich funkcji, co z kolei wpisuje się w nieprawidłowości działania układu odpornościowego opisywane w tych chorobach.

1.4. Diagnostyka nieswoistych zapaleń jelit

Ze względu na brak standardów rozpoznawania nieswoistych zapaleń jelit, rozpoznanie wymaga łącznej analizy wyników badania podmiotowego i przedmiotowego oraz badań pomocniczych. Kluczową rolę odgrywa ocena endoskopowa z biopsją błony śluzowej jelita i badaniem histologicznym (104).

1.4.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe

Wartość diagnostyczna badania podmiotowego i przedmiotowego jest niewielka. Wynika to z przebiegu choroby i zróżnicowania objawów. Główny objaw UC to zwiększenie częstości wypróżnień i luźne stolce. Im większa domieszka krwi w stolcu, tym obraz jest bardziej typowy dla UC. Dolegliwości bólowe w UC dotyczą często lewego dolnego kwadrantu brzucha i nasilają się przed, a ustępują po defekacji (96). W CD biegunka występuje rzadko, częściej pojawiają się bóle brzucha o różnym nasileniu. Dla CD o lokalizacji w jelicie cienkim charakterystyczny jest ból w prawym dolnym kwadrancie jamy brzusznej, często nasilający się po posiłkach.

1.4.2. Badania endoskopowe z oceną histopatologiczną

Rozpoznanie CD jest stawiane zwykle, gdy stwierdza się pełnościennne zapalenie, które w sposób nieciągły zajmuje jelito cienkie i jelito grube, najczęściej z wyłączeniem odbytnicy; towarzyszą mu przetoki. W CD owrzodzenia są zwykle linijne, głębokie, o wałowatych brzegach, a błona śluzowa charakteryzuje się brukowaną powierzchnią. Charakterystycznymi cechami obrazu histologicznego w CD są nacieki zapalne złożone z limfocytów i neutrofilii, przekraczające blaszkę graniczną błony śluzowej i obejmujące warstwę podśluzówkową. Typową dla tej choroby zmianą są ziarniniaki nabłonkowe złożone z makrofagów i limfocytów, o często nieokreślonych granicach. Tylko ziarniniaki zlokalizowane w blaszce właściwej, niezwiązane z uszkodzeniem krypt jelitowych uznaje się za potwierdzenie rozpoznania CD (1; 4; 104; 105; 106).

UC charakteryzuje się najczęściej zapaleniem o typie ciągłym, z początkiem i największym nasileniem zmian w odbytnicy, delikatną łamliwą błoną śluzową, niewyraźną siatką naczyń i obecnością owrzodzeń w miejscach nasilonego procesu zapalnego. Ciągły nacieki zapalny dotyczy tylko błony śluzowej, głębiej może sięgać jedynie w miejscach rozległych owrzodzeń. W preparatach histologicznych stwierdza się w obrębie blaszki właściwej błony śluzowej liczne nacieki złożone z neutrofilii oraz limfocytów i makrofagów, a także zwiększoną liczbę granulocytów kwasochłonnych. W nabłonku błony śluzowej widoczne jest wyraźne zmniejszenie liczby komórek śluzotwórczych. W obrębie krypt

jelitowych widoczne są naciekające neutrofile oraz tzw. mikroropnie krypt (1; 4; 104; 105; 106).

Postęp w badaniach endoskopowych umożliwia stosowanie coraz bardziej zaawansowanej aparatury, co zwiększa możliwości ich stosowania. Duże nadzieje wiąże się z łączeniem różnego rodzaju metod diagnostycznych, np. w endosonografii. Kapsułka endoskopowa pozwala na ocenę jelita cienkiego. Optyczna tomografia koherencyjna, przy penetracji na głębokość 1,5 mm, umożliwia przyżyciową ocenę tkanek na poziomie mikroskopowym. Przy jej użyciu można różnicować UC i CD, wykrywając pełnościennie zmiany zapalne w jelicie, mimo iż kolonoskopia i badanie histopatologiczne nie ujawniły żadnych nieprawidłowości.

1.4.3. Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne odgrywają w diagnostyce IBD rolę pomocniczą. Są one przydatne głównie w różnicowaniu IBD z zaburzeniami czynnościowymi i wykrywaniu wtórnych niedoborów pokarmowych oraz ocenie aktywności choroby. Białka ostrej fazy, m. in. Białko C-reaktywne (CRP), choć nie są swoiste dla IBD, odzwierciedlają nasilenie procesu zapalnego i pomagają w monitorowaniu stanu pacjenta (107). Inne rutynowe badania laboratoryjne, jak morfologia krwi, OB i stężenie albuminy w surowicy, również są przydatne w ocenie nasilenia stanu zapalnego, ale nie rozpoznają, ani nie różnicują IBD (104).

Uzupełnieniem lub alternatywą dla dotychczas stosowanych markerów stanu zapalnego mogą być badania odzwierciedlające aktywację neutrofilii. W szerszym ujęciu, badania te mogą odzwierciedlać przebieg procesu, który rozpoczynają zmiany adhezji do śródbłonna w mikrokrażeniu śluzówkowym ułatwiające przejście limfocytów T i B z naczyń do tkanek objętych zapaleniem, co prowadzi do gromadzenia się tych komórek, ponadto komórek tucznych, makrofagów, eozynofili i aktywowanych neutrofilii (57; 108; 109). Większość badań koncentruje się na komórkach swoistej odpowiedzi immunologicznej: limfocytach i komórkach prezentujących antygen, natomiast mniej wiadomo o patogenetycznej roli neutrofilii w IBD. Badania histologiczne materiału od chorych z CD i UC wykazują obecność neutrofilii w naciekach zapalnych (p. 1.4.2.) (4; 106; 105). W 90% komórek nabłonkowych jelita chorych na IBD stwierdzono zwiększoną zawartość ENA-78 – nabłonkowego peptydu aktywującego neutrofile (57). Pobudzone bodźcem zapalnym

(infekcja, uraz, toksyny) neutrofile wydzielają substancje będące ich składnikami wewnątrzkomórkowymi. Należą do nich enzymy proteolityczne (np. elastaza leukocytarna) oraz liczne białka o działaniu przeciwbakteryjnym, jak kalprotektyna i laktoferyna. Substancje te nie są oznaczane we krwi lub w kale rutynowo, ale mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w diagnostyce IBD jako markery pobudzenia neutrofilii w toku procesu zapalnego.

Elastaza leukocytarna (HLE) jest głównym białkiem wydzielanym przez aktywowane neutrofile, uwalnianym w procesie egzocytozy z ziarnistości azurofilnych i najważniejszym czynnikiem powodującym destrukcję tkanek w chorobach zapalnych (np. ostry zespół niewydolności oddechowej, rozedma płuc, kłębuszkowe zapalenie nerek lub reumatoidalne zapalenie stawów) (110). 90% krążącej we krwi HLE jest związana z endogennym inhibitorem (α_1 -antytrypsyną - α_1 AT) tworząc nieodwracalnie kompleks enzym-inhibitor. W ognisku zapalnym inhibitor ulega inaktywacji przez reaktywne formy tlenu (RFT), pochodzące z aktywowanych neutrofilii (111). W takiej sytuacji niezwiązana z inhibitorem elastaza degraduje proteolitycznie w miejscu objętym procesem zapalnym główne składniki tkanki łącznej: elastynę, kolagen, proteoglikany (112). Elastaza leukocytarna pełni szereg funkcji biologicznych: zwiększa migrację i adhezję neutrofilii, stymuluje produkcję cytokin prozapalnych, trawi receptory fosfatydyloserynowe na makrofagach i zmniejsza zdolność neutrofilii do fagocytozy (113; 114). Ponadto wykazano, że elastaza pochodząca z neutrofilii ma wpływ na proliferację komórek i może zaburzać procesy naprawcze w błonie śluzowej jelit (115).

Kalprotektyna jest grupą heterokompleksów białkowych: MRP-8/MRP-14 lub S100A8/A9 (białka wiążące wapń, podobne do czynników hamujących migrację: MRP-8 [S100A8] oraz MRP-14 [S100A9]). Białka te ulegają ekspresji głównie w cytozolu neutrofilii i monocytów. Tworzenie kompleksów jest procesem zależnym od jonów wapnia. Kalprotektyna stanowi 60% frakcji białek cytoplazmatycznych krążących neutrofilii, również jest obecna w monocytach i makrofagach oraz w tkankowych eozynofilach występujących w jelicie krętym. Monocyty krwi obwodowej eksponują kalprotektynę wewnątrzkomórkowo i zewnątrzkomórkowo, natomiast neutrofile tylko wewnątrzkomórkowo. Kalprotektyna wykazuje działanie antibakteryjne, przeciwgrzybicze i immunomodulacyjne, a także antyproliferacyjne. Oprócz tego jest potencjalnym czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilii. Stężenie kalprotektyny w osoczu jest podwyższone w chorobach związanych ze wzrostem aktywności neutrofilii. Neutrofile mają zdolność migracji przez ścianę jelita, dlatego

kalprotektyna może być obecna w kale. Wykazano, że stężenie kalprotektyny w kale znacząco wzrasta w chorobach jelit, takich jak CD, UC i nowotwory okrężnicy (116). Kalprotektyna w kale może być markerem użytecznym w wykrywaniu procesu zapalnego w jelicie (117), pomocnym w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit. Co ciekawe, podwyższony poziom kalprotektyny w kale został także opisany u zdrowego krewnego pierwszego stopnia pacjenta z CD, co może wskazywać na przydatność w ocenie ryzyka rozwinięcia się choroby u krewnych pacjentów (118). Obecnie podejmowane są próby wprowadzenia do praktyki klinicznej kalprotektyny oznaczanej w kale jako badania rutynowego.

Laktoferyna jest glikoproteiną z klasy transferaz produkowaną głównie przez neutrofile. Bierze udział w odpowiedzi immunologicznej nieswoistej dzięki dużemu powinowactwu do żelaza, jego „wyłapywaniu” i blokowaniu dostępności dla bakterii. Jedną z cech tego białka jest jego oporność na działanie enzymów proteolitycznych, co pozwala na jego przejście przez przewód pokarmowy w postaci niezmienionej. Laktoferyna odgrywa ponadto istotną rolę w modulowaniu procesów przeciwzapalnych. Pierwsze doniesienia o przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale pacjentów chorych na IBD pojawiły się po roku 2000 (119). Podobnie jak w przypadku kalprotektyny, podejmowane są próby wdrożenia oznaczania laktoferyny do oceny stanu klinicznego pacjentów. Badania potwierdzają, że badanie wykrywające laktoferynę w kale może okazać się użyteczne w diagnostyce CD i UC ze względu na dużą czułość i swoistość diagnostyczną (120).

Komórki błony śluzowej jelita poddane działaniu czynników uszkodzających, np. w przebiegu stanu zapalnego, uwalniają na zewnątrz składniki cytoplazmy, m. in. białka wiążące wolne kwasy tłuszczowe, których przykładem jest I-FABP (*intestinal fatty acid binding protein*) – swoiste dla nabłonka jelitowego białko wiążące długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwasy żółciowe oraz retinoidy. I-FABP jest produkowane tylko w dojrzałych enterocytach jelita cienkiego, może więc być uznane za swoisty marker uszkodzenia/martwicy tych komórek. Ludzkie I-FABP stanowi w przybliżeniu 1-2% składu białek cytozolowych dojrzałych enterocytów (121). Dotychczas niewiele wiadomo na temat roli I-FABP w diagnostyce IBD.

Jednym z czułych wskaźników aktywacji odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego jest neopteryna. Badanie stężenia neopteryny w różnych płynach ustrojowych dostarcza informacji o aktualnym stanie odpowiedzi immunologicznej i może pomóc w przewidywaniu progresji choroby. Uwalnianie neopteryny rozpoczyna się średnio trzy dni przed osiągnięciem przez komórki T maksimum proliferacji. Wzrost biosyntezy neopteryny

obserwuje się około tygodnia przed pojawieniem się specyficznych przeciwciał, dlatego neopteryna rekomendowana jest jako wczesny marker reakcji zapalnej (122). W świetle tych danych oznaczanie neopteryny w surowicy może okazać się użytecznym narzędziem w ocenie aktywności klinicznej IBD (123).

W diagnostyce i różnicowaniu IBD coraz większą uwagę poświęca się ostatnio oznaczaniu niektórych przeciwciał. Przypuszcza się, że mogą one być markerami wskazującymi na zaburzenia immunologiczne, w tym reakcje krzyżowe z antygenami pochodzenia środowiskowego. Analizowano przydatność wielu markerów serologicznych w różnicowaniu, monitorowaniu aktywności, rokowaniu i wyborze optymalnej terapii IBD. Pewne nadzieje wiąże się z przeciwciałami skierowanymi przeciwko cytoplazmie neutrofilii (*anti neutrophil cytoplasmic antibodies – ANCA*) oraz przeciwko elementom ściany komórkowej grzybów *Saccharomyces cerevisiae* (*anti Saccharomyces cerevisiae autoantibodies – ASCA*). Przeciwciała ANCA wykrywano początkowo w surowicy chorych na różne typy zapaleń naczyń. Terminem atypowe pANCA (ze świeceniem okołojądrowym w metodzie immunofluorescencji pośredniej) określa się przeciwciała niereagujące z mieloperoksydazą, występujące głównie w IBD i stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych (*primary sclerosing cholangitis – PSC*) (104). Przeciwciała pANCA występują u 50–80% pacjentów z UC i jedynie u 5–10% z CD. Zaobserwowano ponadto, że przeciwciała te występują także u ok. 15% krewnych pierwszego stopnia chorych na UC (124). Niepatogenne grzyby *S. cerevisiae* znajdujące się w produktach spożywczych nie wydają się być czynnikiem etiologicznym CD. Wśród pacjentów z IBD, przeciwciała ASCA są bardziej charakterystyczne dla CD – występują w 50–70% przypadków, a tylko w 5–15% przypadków UC (125). Ze względu na to, że przeciwciała nie występują u wszystkich pacjentów z IBD, poszukuje się nowych przeciwciał przeciwko antygenom bakteryjnym lub autoprzeciwciał, które będą pomocne w diagnostyce różnicowej. Istnieje także potrzeba opracowania badań identyfikujących podgrupy pacjentów, u których skuteczne mogłoby okazać się leczenie skierowane przeciwko mikroorganizmom patogennym. Dotychczas poznano wiele takich przeciwciał, przydatnych także w różnicowaniu IBD, m.in. przeciwko antygenom białka kanałowego C ściany komórkowej *E. coli* (anty-OmpC), przeciwko białku podobnemu do histonu mykobakterii (Hup-B), przeciwko sekwencji I2 *Pseudomonas fluorescens* (anty-I2) i przeciwko peptydoglikanowi bakterii (ALCA, AMCA, ACCA). Wykrywano także przeciwciała przeciwko własnym komórkom i tkankom: przeciwciała przeciwko komórkom kubkowym jelita (GAB), charakteryzujące UC, oraz przeciwko antygenom

zewnątrzwydzielniczej części trzustki (PAB), występujące częściej w CD, reagujące z katepsyną G czy reagujące z flagelliną CBir1 (*anti-CBir1 flagellin*) (126; 127; 128). Badane w nieswoistych zapaleniach jelit przeciwciała pANCA, ASCA, I2 i OmpC łącznie występują u 80% pacjentów z CD, tylko 20% chorych pozostaje seronegatywnych. Być może, wraz poszerzeniem panelu badanych przeciwciał staną się one decydującym elementem w diagnostyce różnicowej IBD (104).

1.4.4. Problemy w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit

Pomimo zastosowania wszelkich dostępnych metod diagnostycznych, rozpoznanie nie zawsze jest możliwe do ustalenia, a obraz endoskopowy i mikroskopowy IBD – jednoznaczny. Bardzo często ocena kliniczna nie pokrywa się z diagnozą postawioną na podstawie badania makro- i mikroskopowego. Problemy w różnicowaniu IBD są związane z:

- efektem działania na błonę śluzową wieloletniego zapalenia i leczenia,
- niepowodzeniem w znalezieniu cech charakterystycznych dla CD (prześciennego czy odcinkowego zapalenia, ziarniniaków, głębokich szczelinowatych owrzodzeń, zajęcia jelita cienkiego),
- bardzo szybkim przebiegiem zapalenia (nakładanie się typowych cech obu jednostek, zarówno makroskopowych, np. linijne owrzodzenia czy szczeliny, jak i histopatologicznych, np. komórki olbrzymie związane z kryptami),
- zapaleniem jelita biodrowego z zarzucania (*backwash ileitis*), tj. łagodnym zapaleniem obejmującym kilka jego końcowych centymetrów, występującym u chorych z *pancolitis* w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego,
- dyskretnymi zmianami w odbytnicy w UC - tzw. oszczędzenie odbytnicy (*relative rectal sparing*) ze zmianami o większym nasileniu proksymalnie do odbytnicy (124).

U ok. 10–15% pacjentów nie można postawić ostatecznej diagnozy, przypadki te określa się jako postać nieokreśloną, graniczną (*indeterminate colitis – IC*). Rozpoznawanie nieokreślonego zapalenia jelit budzi kontrowersje. Można je traktować jako oddzielną jednostkę chorobową o patogenezie odmiennej od UC i CD lub jedynie jako rozpoznanie wstępne, które ulega zmianie po zastosowaniu wszystkich dostępnych metod diagnostycznych (129). W publikowanych pracach stosuje się różne kryteria rozpoznania IC, co znacznie

utrudnia porównanie wyników badań. Dodatkowo, doświadczenie endoskopistów i patologów z różnych ośrodków też może być odmienne (104).

Również omówione powyżej problemy w diagnostyce IBD wskazują na potrzebę poszukiwania nowych metod diagnostycznych, w tym markerów biochemicznych wykraczających poza samą ocenę nasilenia stanu zapalnego – pozwalających na poprawę trafności diagnostyki CD i UC. Ocena tego rodzaju markerów-kandydatów jest przedmiotem niniejszej pracy.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest ocena przydatności oznaczania wybranych białek uwalnianych z neutrofilów, swoistego dla komórek nabłonka jelit białka I-FABP oraz wybranych przeciwciał w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit (choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego), w szczególności w diagnostyce różnicowej tych chorób oraz ocenie ich aktywności klinicznej.

Szczegółowe cele pracy obejmują:

- Porównanie stężenia elastazy leukocytarnej, laktoferyny i kalprotektyny w osoczu chorych na CD, UC i w grupie kontrolnej.
- Ocenę związku markerów granulocytarnych z liczbą leukocytów i neutrofilów u chorych na CD, UC i w grupie kontrolnej.
- Porównanie stężenia I-FABP w osoczu chorych na CD, UC oraz w grupie kontrolnej.
- Porównanie stężenia neopteryny w osoczu chorych na CD, UC i w grupie kontrolnej.
- Ocenę związku pomiędzy stężeniem elastazy leukocytarnej, laktoferyny, kalprotektyny, I-FABP i neopteryny z aktywnością CD i UC.
- Ocenę występowania autoprzeciwciał ASCA, ANCA, GAB, LFS, CUZD1 i GP2 we krwi chorych na CD, UC i w grupie kontrolnej.
- Ocenę przydatności powyższych badań w diagnostyce IBD, w tym w różnicowaniu CD i UC.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Badane grupy

Badaniem objęto grupę 60 chorych na nieswoiste zapalenia jelit, w wieku od 18 do 64 lat – 33 pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i 27 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Badani byli hospitalizowani w Oddziale Klinicznym Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2010 do 2013. Kryteriami wykluczenia z grupy badanej były współistniejące choroby nowotworowe, układu wewnątrzwydzielniczego, cukrzyca, otyłość, choroba niedokrwienna serca oraz choroby układowe.

Rozpoznanie CD oraz UC ustalono na podstawie kryteriów klinicznych oraz obrazowych obejmujących badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz badanie endoskopowe i histopatologiczne pobranych wycinków błony śluzowej jelita.

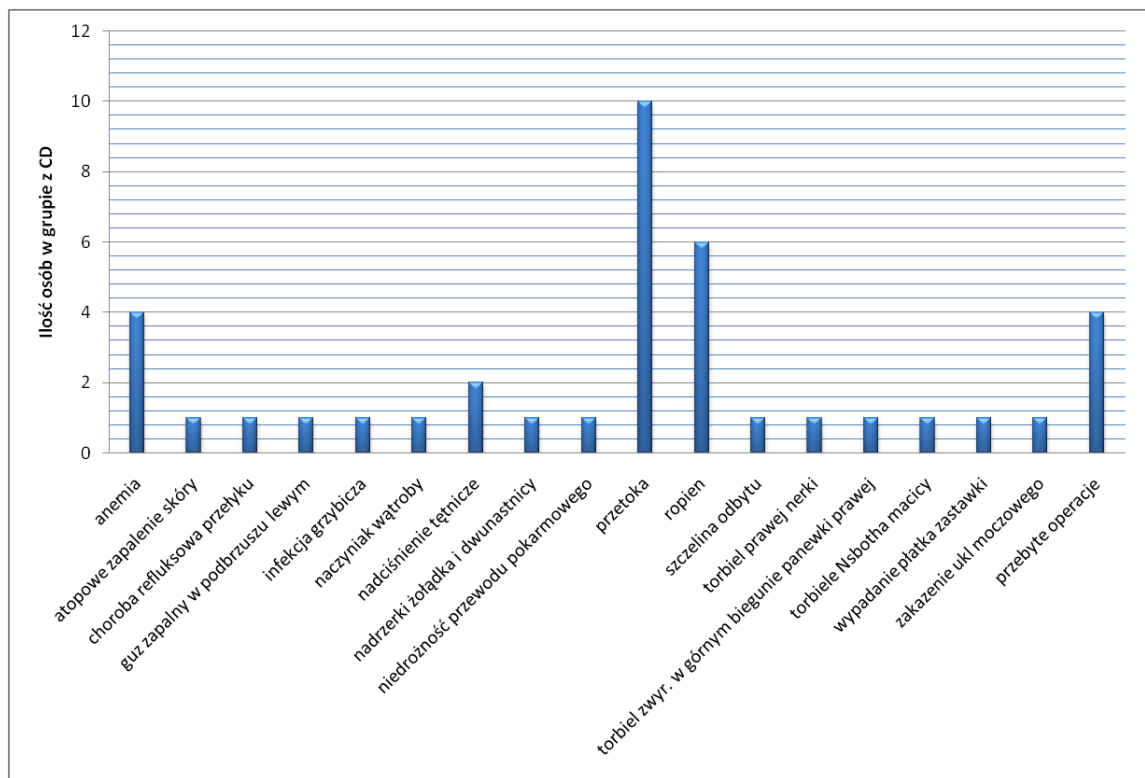
Tabela 1. Charakterystyka grup badanych

	Choroba Leśniowskiego – Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Grupa Kontrolna
N	27	33	20
Płeć [K/M]	13/14	15/18	12/8
Wiek* [lata]	36,6	36,0	40,6
Czas trwania choroby* [lata]	4,95	5,09	-
Zaostrzenie [n/%]	18/66,7%	23/69,7%	-
Remisja [n/%]	9/33,3%	10/30,3%	-
Terapia immunosupresyjna [n/%]	16/59,3	14/42,4%	-
Aminosalicylany [n/%]	22/81,5%	33/100,0%	-
Glikokortykosterydy [n/%]	8/29,6%	15/45,5	-
Antybiotykoterapia [n/%]	6/22,2%	6/18,2%	-
Leczenie biologiczne [n/%]	0/0,0%	3/9,1%	-

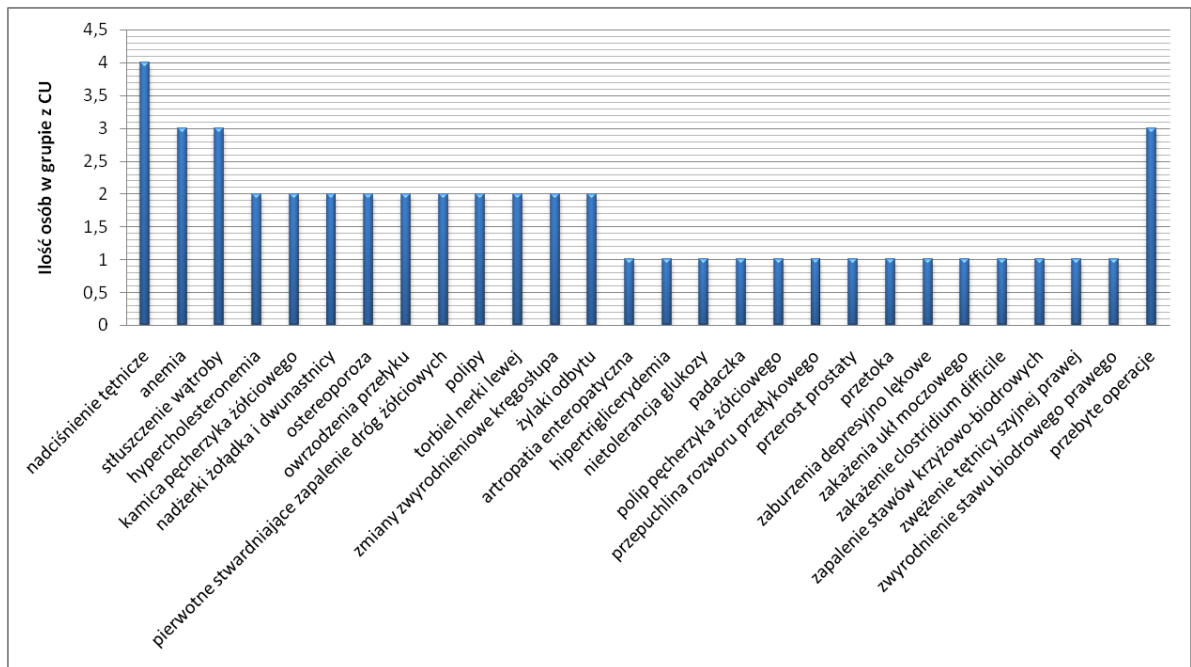
*wyniki przedstawione w postaci średniej arytmetycznej

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób w wieku 20 do 61 lat (Tab. 1) Kryteriami wykluczenia z grupy kontrolnej były współistniejące choroby przewlekłe, choroby przewodu pokarmowego, choroby nowotworowe.

Na ryc. 5 i 6 przedstawiono występowanie powikłań, współistniejące choroby oraz przebyte operacje w badanej grupie pacjentów chorych na CD i UC.



Rycina 5. Charakterystyka pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (przebyte powikłania, współistniejące choroby, przebyte operacje)



Rycina 6. Charakterystyka pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (przebyte powikłania, współistniejące choroby, przebyte operacje)

Pacjenci zapoznali się z informacją o badaniu i wyrazili na nie pisemną zgodę. Projekt został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (nr KBET/135/B/2009 z dnia 29 października 2009.) oraz sfinansowany z grantu Narodowego Centrum Nauki **PRELUDIUM nr DEC- 2011/01/N/NZ5/02757**.

Aktywność CD została oceniona w oparciu o indeks CDAI (*Crohn's Disease Activity Index*) opracowanego przez Besta i wsp. z Midwest Regional Health Center w Illinois (Tab. 2) (130). Za łagodną postać choroby przyjęto wskaźnik CDAI od 150 do 220. Taki stan odpowiada pacjentowi, który może się poruszać, jeść i pić, a utrata masy ciała nie przekracza 10%. Przewód pokarmowy jest drożny, brak gorączki, odwodnienia oraz badanego oporu i tkliwości brzucha. Stężenie CRP znajduje się zazwyczaj w granicach prawidłowych. Umiarkowana postać choroby odpowiada wskaźnikowi CDAI od 220 – 450. U pacjenta mogą występować okresowe wymioty lub utrata masy ciała przekraczająca 10%. Umiarkowaną postać choroby stwierdza się również, gdy leczenie łagodnej postaci jest nieskuteczne lub w badaniu jamy brzusznej stwierdza się tkliwy opór. Stężenie CRP przekracza granice prawidłowe. U pacjentów z CDAI powyżej 450 stwierdza się ciężką postać choroby, która odpowiada stanowi z niedrożnością jelit lub ropniem, albo, gdy wskaźnik masy ciała (BMI) jest mniejszy od 18 kg/m². U tych chorych objawy choroby utrzymują się pomimo intensywnego leczenia. Stężenie CRP jest podwyższone (130).

Badana grupa chorych na CD została podzielona na pacjentów w remisji (wskaźnik CDAI poniżej 220, n=9.) oraz z zaostrzeniem (wskaźnik CDAI równy lub powyżej 220, n=18).

Tabela 2. Obliczanie wskaźnika aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (CDAI) wg Besta i wsp (124)

1. Liczba luźnych stolców / tydzień	Suma	x2
2. Bóle brzucha w skali od 0-3 / tydzień	Suma	x5
3. Samopoczucie w skali 0-4 / tydzień	Suma	x7
4. Objawy i powikłania (0,1 za każdy)	Suma	x20
5. Leki antyperystaltyczne (0,1)		x30
6. Opór w jamie brzusznej (0,2,5)		x10
7. Hematokryt (Ht)		
Kobiety (42 - Ht)		x6
Mężczyźni (47 - Ht)		
8. Masa ciała (% poniżej masy należnej)		x1
łącznie liczba punktów		
		<150 remisja
		>150 aktywna faza choroby
		>450 bardzo ciężki rzut choroby

Stan pacjentów z UC był klasyfikowany wg kryteriów Truelove-Wittsa (Tab. 3) (131)

Tabela 3. Klasyfikacja wrzodziejacego zapalenia jelita grubego na podstawie cech klinicznych wg Truelove-Wittsa (125)

Postać	Cechy kliniczne
Łagodna	<4 wypróżnień dziennie z domieszką krwi lub bez Brak gorączki, tachykardii i niedokrwistości, prawidłowe OB.
Umiarkowana	4-6 wypróżnień dziennie z domieszką krwi lub bez Minimalne zaburzenia układowe
Ciężka	>6 wypróżnień dziennie z domieszką krwi Zaburzenia układowe: gorączka, tętno>90/min, niedokrwistość, OB.>30mm po 1 godzinie

Na podstawie wymienionych w Tab. 3 cech klinicznych, wyróżniono zgodnie z aktywnością kliniczną choroby postać ciężką, umiarkowaną i łagodną (131).

Stan pacjentów chorych na UC podzielono na nieaktywną fazę choroby (remisja - na podstawie skali Truelove-Wittsa postać łagodna, n=10) i na aktywną fazę choroby (zaosyżenie - na podstawie skali Truelove-Wittsa postać umiarkowana i ciężka, n=23).

3.2. Metody

3.2.1. Materiał badany

Od wszystkich badanych pobierano krew z żyły łokciowej, na czczo, w godzinach porannych (7:00-9:00) do dwóch probówek (2x4,9 ml) zawierających EDTA oraz jednej probówki (4,9 ml) zawierającej aktywator krzepnięcia. Następnie probówki były wirowane w standardowych warunkach (1000g przez 10 min, temp. 15 °C). Odpowiednio osocze i surowicę rozporcjowano do probówek polipropylenowych przeznaczonych do głębokiego mrożenia i materiał przechowywano w temp. -70 °C do czasu wykonania oznaczeń.

3.2.2. Rutynowe badania laboratoryjne

W trybie rutynowej diagnostyki laboratoryjnej, u pacjentów i w grupie kontrolnej wykonano morfologię krwi z obrazem odsetkowym oraz stężenie białka CRP w surowicy. Powyższe badania zostały wykonane przy użyciu standaryzowanych i kontrolowanych metod w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

3.2.3. Badania wykonane metodą immunoenzymatyczną ELISA

Elastazę leukocytarną (HLE) oznaczano w osoczu przy użyciu odczynników Human PMN Elastase ELISA (BioVendor (Republika Czech). Zestaw odczynników służy do oznaczania kompleksów HLE/ α_1 AT i wykorzystuje 2 rodzaje przeciwciał: związane z płytką poliklonalne przeciwciała przeciwko HLE oraz sprzężone z peroksydazą chrzanową królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko α_1 AT (koniugat). Zestaw charakteryzował się 100% swoistością dla kompleksu HLE/ α_1 AT i czułością analityczną 3 ng/ml. Zakres oznaczalności wynosił od 10 do 1000 ng/ml HLE/ α_1 AT.

Kalprotektynę oznaczano w osoczu przy użyciu odczynników Human Caprotectin (Hycult Biotechnology, USA). Zestaw zawiera 2 rodzaje przeciwciał: związane z płytką przeciwciała przeciwko heterodimerowi ludzkiej kalprotektyny oraz sprzężone z biotyną przeciwciała przeciwko kalprotektynie. Zestaw charakteryzował się 100% swoistością dla ludzkiej kalprotektyny i czułością analityczną 1,6 ng/ml. Zakres oznaczalności wynosił od 1,6 do 100 ng/ml.

Laktoferynę oznaczano w osoczu przy użyciu odczynników Human Lactoferrin (Hycult Biotechnology, USA). Zestaw zawiera 2 rodzaje przeciwciał: związane z płytką przeciwciała skierowane przeciw ludzkiej laktoferynie oraz sprzężone z biotyną przeciwciała skierowane przeciwko laktoferynie. Zestaw charakteryzował się 100% swoistością dla ludzkiej laktoferyny i czułością analityczną 0,4 ng/ml. Zakres oznaczalności wynosił od 0,4 do 100 ng/ml.

Z wyników oznaczeń białek granulocytarnych oraz liczby leukocytów i neutrofilii wykonano wskaźniki. W tym celu podzielono wyniki oznaczeń stężenia odpowiednio kalprotektyny, laktofryny i elastazy przez liczbę leukocytów i neutrofilii. Wyliczone wskaźniki miały na celu ocenę aktywności neutrofilii oraz wpływu liczby komórek na stężenia białek granulocytarnych w badanych grupach.

Jelitowe białko wiążące wolne kwasy tłuszczowe (I-FABP) oznaczano w osoczu przy użyciu odczynników Human I-FABP (Hycult Biotechnology, USA). Zestaw zawiera 2 rodzaje przeciwciał: związane z płytką przeciwciała przeciwko ludzkiemu I-FABP oraz sprzężone z biotyną przeciwciała przeciwko I-FABP. Zestaw charakteryzował się 100% swoistością dla I-FABP i czułością analityczną 47 pg/ml. Zakres oznaczalności wynosił od 47 do 3000 pg/ml.

Neopterynę oznaczano w osoczu przy użyciu odczynników firmy IBL International (Niemcy). Zestaw odczynników jest oparty o kompetycyjną metodą ELISA. Antygen w próbce i znakowany enzymem antygen w zestawie odczynników „rywalizują” o miejsca wiążące króliczych przeciwciał przeciwko neopterynie. Następnie kompleksy antygen-przeciwciała dołączają się do związanych z płytką kozich przeciwciał przeciwko przeciwciałom króliczym. Niezwiązany antygen jest odpłukiwany. Zestaw charakteryzował się 100% swoistością dla I-FABP i czułością analityczną 1,35 nmol/l. Zakres oznaczalności wynosił od 1,35 do 111 nmol/l neopteryny.

3.2.4 Badania wykonane przy użyciu immunofluorescencji pośredniej

Obecność wybranych przeciwciał oceniono przy użyciu odczynników Mozaika CIBD (Euroimmun, Niemcy) metodą immunofluorescencji pośredniej (IF). W teście, jako substrat znajdujący się na szkiełku Biochip, stosuje się:

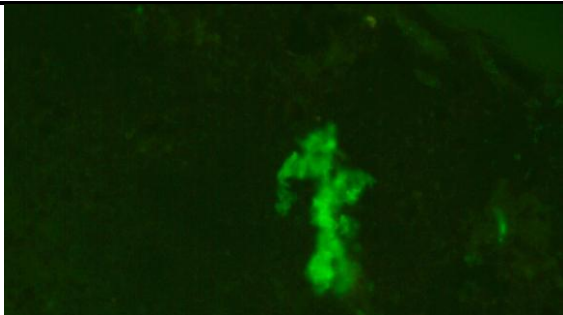
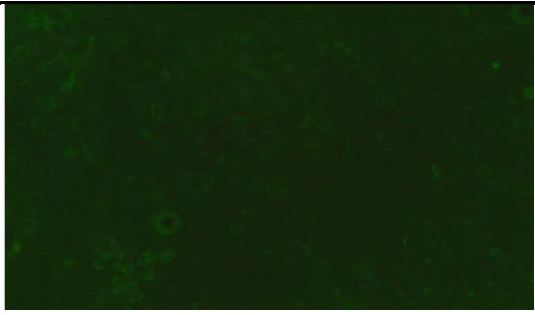
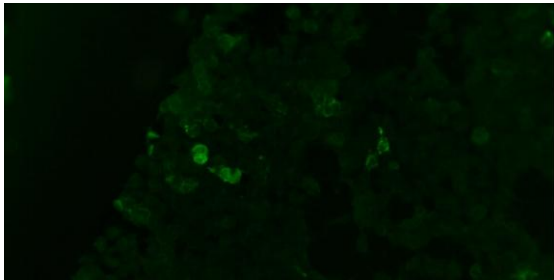
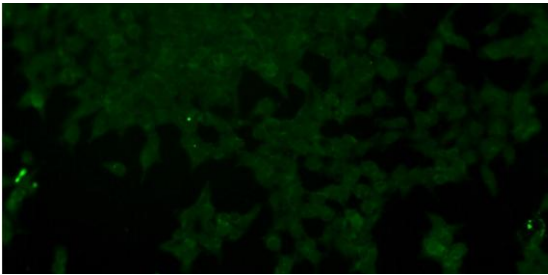
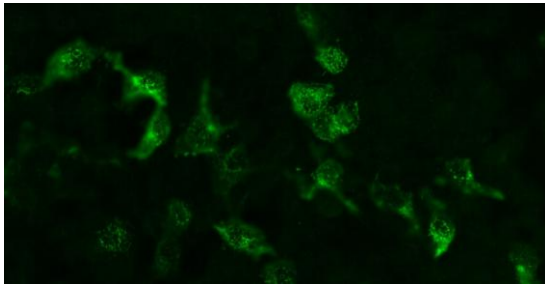
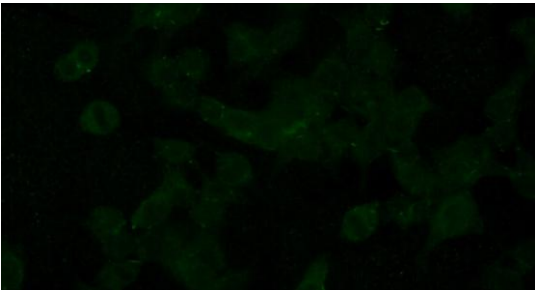
- skrawki jelita małpy (zróżnicowane komórki kubkowe jelita) do oznaczenia autoprzeciwciał przeciwko komórkom kubkowym jelita (anty-GAB),
- utrwalone etanolem granulocyty do oznaczania przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilii (ANCA),
- granulocyty selektywnie reagujące z laktoferyną (granulocyty LFS) do oznaczenia przeciwciał przeciw laktoferynie związanej z DNA (przeciwciała LFS),
- transfekowane komórki (EU90) do oznaczania przeciwciał przeciwko antygenom trzustkowym (przeciw proteoglikanom GP2 i CUZD1),
- komórki drożdży piekarskich do oznaczenia przeciwciał przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA),
- komórki nietransferowane –kontrola negatywna dla przeciwciał przeciwko antygenom trzustkowym,
- HSS neutrofile –kontrola negatywna dla przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilii.

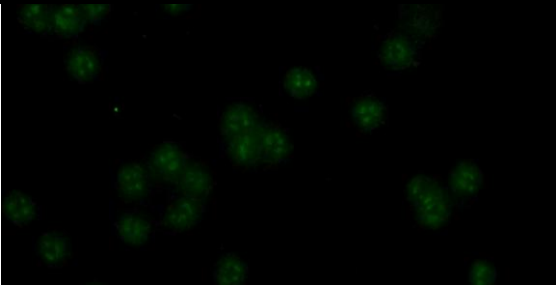

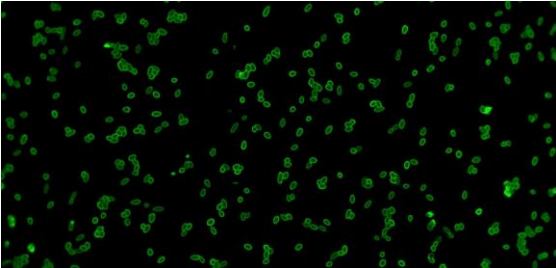
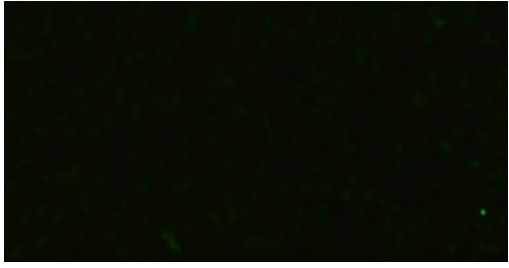
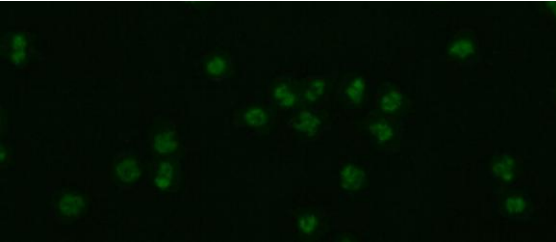

Wykonując badania, 30 µl surowicy rozcieńczonej 1:10 buforem PBS-Tween nakładano na pole reakcyjne do wykrycia przeciwciał ANCA, GP2 i CUZD1, LFS, GAB, oraz 30 µl surowicy rozcieńczonej 1:100 buforem PBS-Tween nakładano na pole reakcyjne do wykrycia przeciwciał ASCA. Następnie pola reakcyjne przykrywano szkiełkiem BIOCHIP zawierającym odpowiednie skrawki tkankowe oraz linie komórkowe (technika Titerplane).

Dzięki tej technice każde pole z substratem zostało zanurzone w kropli rozcieńczonej surowicy i reakcje rozpoczynały się jednocześnie na całym szkiełku w identycznych warunkach. Po 30 min. inkubacji i płukaniu, na pola reakcyjne наносono 25 µl znakowanych fluoresceiną przeciwciał przeciwko ludzkim IgG. Następnie pola reakcyjne przykrywano szkiełkiem Biochip z ewentualnie związanymi przeciwciałami pacjenta. Po 30 min. inkubacji i odpłukaniu nadmiaru odczynnika, szkiełko Biochip przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i oceniano fluorescencję pod mikroskopem (powiększenie 20x, filtr wzbudzający 488 nm, filtr odcinający 510 nm, filtr barierowy 520 nm).

Jeśli wynik badania jest dodatni, swoiste przeciwciała wiążą się z antygenami (substratami) i obserwuje się dla nich odpowiedni wzór fluorescencji (świecenia) (Tab. 4).

Tabela 4. Ocena mikroskopowa reakcji na szkiełku Biochip służącym do badania przeciwciał panelu jelitowego CIBD

przeciwciało	Opis fluorescencji (świecenia)	Wynik dodatni	Wynik negatywny
GAB Przeciwciało przeciwko komórkom kubkowym jelita	Cytoplazma komórek kubkowych wykazuje gęstą fluorescencję o rozmytych brzegach, płaszczyzna fluorescencji wydaje się być nad tkanką		
GP2 Przeciwciała przeciwko glikoproteinie 2	Obserwuje się płaską, ziarnistą fluorescencję w cytoplazmie, podczas gdy jądro jest słabo wybarwione - wzór siatkowaty		
CUZD1 Przeciwciała przeciwko glikoproteinie CUZD1	Obserwuje się wyraźną, ziarnistą perinuklearną fluorescencję w cytoplazmie – wzór kropłopodobny		

przeciwciało	Opis świecenia	Wynik pozytywny	Wynik negatywny
LFS Przeciwciała przeciwko laktoferynie związanej z DNA	Jądrowy typ fluorescencji, z wyraźnymi kropelkami		
ASCA Przeciwciała przeciwko <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fluorescencja widoczna jako wyraźne świecenie całych komórek, szczególnie ich brzegów		
ANCA Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofili	Typ okołojądrowy świecenia, gładka fluorescencja skupiona wokół jądra komórkowego		

3.3 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica 10 (StatSoft®, licencja dla UJ CM). Za znamiennej poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Normalność rozkładu zmiennych badano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Jeżeli zmienne miały rozkład zbliżony do normalnego, wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego, a różnice w grupach oceniano przy pomocy testu t. Jeżeli parametry miały rozkład różny od normalnego, wyniki przedstawiono w postaci mediany, a rozrzut w postaci pierwszego i trzeciego kwartyła, natomiast różnice w grupach oceniono przy pomocy testu U Manna-Whitneya. Wykonano także analizę korelacji, regresji prostej i regresji logistycznej dla uzyskanych wyników.

Tabela 5. Wzory na parametry charakterystyki diagnostycznej testu

Parametr	Wzór
Dokładność ACC	$\frac{PD+PU}{PD+FD+PU+FU}$
Czułość	$\frac{PD}{PD+FU}$
Swoistość	$\frac{PU}{PU+FD}$
Wartość predykcyjna wyniku dodatniego PPV	$\frac{PD}{PD+FD}$
Wartość predykcyjna wyniku ujemnego NPV	$\frac{PU}{PU+FU}$
Iloraz prawdopodobieństw dla wyniku dodatniego LR+	$\frac{\text{Czułość}}{(1 - \text{Swoistość})}$

PD – ilość wyników prawdziwie dodatnich

FD – ilość wyników fałszywie dodatnich

PU – ilość wyników prawdziwie ujemnych

FU – ilość wyników fałszywie ujemnych

Kolejnym etapem analizy statycznej była ocena użyteczności diagnostycznej ocenianych badań laboratoryjnych. Przy pomocy analizy krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristics*) wybrano punkty odcięcia dla wyników badań oraz wyliczono dla nich dokładność (*accuracy* - ACC), czułość diagnostyczną, swoistość diagnostyczną, wartość predykcyjną wyniku dodatniego (*positive predictive value* - PPV), wartość predykcyjną wyniku ujemnego (*negative predictive value* – NPV), a także iloraz prawdopodobieństw dla wyniku dodatniego (*likelihood ratio* – LR+) wg wzorów podanych w Tab. 5. W ocenie badanych testów wykorzystano także pole pod krzywą ROC (*area under the curve*, AUC).

4. WYNIKI

4.1. Rozkład wyników oraz ocena różnic zależnych od płci

Rozkład wyników badań oceniono przy użyciu testu Shapiro-Wilka w poszczególnych grupach badanych. Rozkład wyników oznaczeń liczby erytrocytów (RBC) i hematokrytu oraz stężenia laktoferyny, kalprotektyny i elastazy w osoczu był zgodny z rozkładem normalnym, dlatego analizę tych danych przeprowadzono przy użyciu testów parametrycznych. Dla pozostałych badań rozkład wyników nie był zgodny z rozkładem normalnym, dlatego dalszą analizę wykonano przy pomocy testów nieparametrycznych. W przypadku wyników o rozkładzie niezgodnym z rozkładem normalnym do oceny korelacji Pearsona został użyty logarytm dziesiętny ze zmiennych.

Porównano wyniki wybranych badań u kobiet i mężczyzn, odpowiednio w grupie kontrolnej, grupie pacjentów z CD oraz grupie pacjentów z UC. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, dalszą analizę liczby erytrocytów, hematokrytu i stężenia hemoglobiny, przeprowadzono osobno w grupie kobiet i mężczyzn.

4.2 Wyniki badań morfologii krwi

Spośród rutynowych badań laboratoryjnych analizie poddano uzyskane w badanych grupach wyniki morfologii krwi. Porównanie jej wyników u pacjentów z CD i w grupie kontrolnej przedstawiono w Tab. 6. Średnie i mediany uzyskanych wyników mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Liczba leukocytów, neutrofilii i płytek krwi była znamienne większa u pacjentów z CD niż w grupie kontrolnej, natomiast stężenie hemoglobiny u mężczyzn, liczba limfocytów i monocytów były znamienne mniejsze u pacjentów z CD niż w grupie kontrolnej.

Porównanie wyników morfologii krwi w grupie chorych na UC i w grupie kontrolnej przedstawiono w Tab. 7. Wartości średnie wyników (średnia arytmetyczna lub mediana) mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Liczba trombocytów i neutrofilii były znamienne większe u pacjentów chorych na UC niż w grupie kontrolnej. Jedynie liczba bazofili była znamienne większa u osób zdrowych niż u pacjentów z UC.

Tabela 6. Porównanie wyników morfologii krwi u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i w grupie kontrolnej

	Płeć	Wartości referencyjne	Choroba Leśniowskiego-Crohna	Grupa Kontrolna	p
WBC		4,0 -10,0 [$10^3/\mu\text{l}$]	8,3 (6,2-10,0)	5,7 (4,9-6,6)	0,0031
RBC	K	3,5-5,0 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,5±0,6	4,5±0,2	0,66693
	M	4,5-6,5 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,8±0,6	5,2±0,3	0,26077
HGB	K	11,0-15,0 [g/l]	12,1 (11,2-13,5)	13,4 (13,0-13,7)	0,05064
	M	12,0-17,0 [g/l]	12,6 (11,5-13,6)	14,6 (14,3-15,1)	0,01587
HTC	K	35,0-47,0 [%]	37,1 (34,3-40,8)	38,9 (37,8-40,1)	0,25782
	M	40,0-54,0 [%]	39,3 (35,3-43,7)	42,8 (42,5-43,8)	0,08722
PLT		125-340 [$10^3/\mu\text{l}$]	312 (274-447)	229 (195-276)	0,00015
Neutrofile		2,40-7,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	6,25 (4,14-7,44)	3,02 (2,35-3,75)	0,00016
Limfocyty		0,80-4,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	1,2 (0,92-2,15)	1,86 (1,36-2,21)	0,02655
Monocyty		0,16-0,80 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,50 (0,40-0,81)	0,48 (0,39-0,56)	0,53384
Eozynofile		0,04-0,30 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,10 (0,10-0,19)	0,13 (0,09-0,24)	0,3104
Bazofile		0,00-0,10 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,0 (0,0-0,0)	0,02 (0,01-0,02)	0,00002

p – poziom istotności statystycznej

K- kobiety

M mężczyźni

Tabela 7. Porównanie wyników morfologii krwi u pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i w grupie kontrolnej

	Płeć	Wartości referencyjne	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Grupa kontrolna	P
WBC		4,0 -10,0 [$10^3/\mu\text{l}$]	6,4 (5,3-8,9)	5,7 (4,9-6,6)	0,07246
RBC	K	3,5-5,0 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,3±0,6	4,5±0,2	0,18875
	M	4,5-6,5 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,7±0,7	5,2±0,3	0,13957
HGB	K	11,0-15,0 [g/l]	12,9 (10,5-13,8)	13,4 (13,0-13,7)	0,12663
	M	12,0-17,0 [g/l]	14,4 (12,5-14,6)	14,6 (14,3-15,1)	0,27783
HTC	K	35,0-47,0 [%]	38,4 (31,1-40,8)	38,9 (37,8-40,1)	0,47145
	M	40,0-54,0 [%]	41,1 (38,0-43,6)	42,8 (42,5-43,8)	0,26262
PLT		125-340 [$10^3/\mu\text{l}$]	274 (243-361)	229 (195-276)	0,02582
Neutrofile		2,40-7,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	4,00 (,3,20-5,58)	3,02 (2,35-3,75)	0,01465
Limfocyty		0,80-4,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	1,50 (1,20-1,73)	1,86 (1,36-2,21)	0,05457
Monocyty		0,16-0,80 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,50 (0,37-0,70)	0,48 (0,39-0,56)	0,72185
Eozynofile		0,04-0,30 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,10 (0,05-0,24)	0,13 (0,09-0,24)	0,45780
Bazofile		0,00-0,10 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,00 (0,0-0,0)	0,02 (0,01-0,02)	0,00010

p – poziom istotności statystycznej

K- kobiety

M mężczyźni

W Tab. 8 przedstawiono porównanie wyników morfologii krwi w grupie pacjentów chorych na UC i w grupie pacjentów z CD. Jedynie liczba neutrofilów była znacząco większa u pacjentów z CD niż w grupie chorych na UC, pozostałe wyniki nie różniły się znacząco między grupami.

Tabela 8. Porównanie wyników morfologii krwi u pacjentów chorych Chorobą Leśniowskiego-Crohna i u pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego

	Płeć	Wartości referencyjne	Choroba Leśniowskiego-Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	P
WBC		4,0 -10,0 [$10^3/\mu\text{l}$]	8,3 (6,2-10,0)	6,4 (5,3-8,9)	0,16666
RBC	K	3,5-5,0 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,5±0,6	4,3±0,6	0,51645
	M	4,5-6,5 [$10^6/\mu\text{l}$]	4,8±0,6	4,7±0,7	0,62500
HGB	K	11,0-15,0 [g/l]	12,1 (11,2-13,5)	12,9 (10,5-13,8)	0,76970
	M	12,0-17,0 [g/l]	12,6 (11,5-13,6)	14,4 (12,5-14,6)	0,10263
HTC	K	35,0-47,0 [%]	37,1 (34,3-40,8)	38,4 (31,1-40,8)	0,92226
	M	40,0-54,0 [%]	39,3 (35,3-43,7)	41,1 (38,0-43,6)	0,57208
PLT		125-340 [$10^3/\mu\text{l}$]	312 (274-447)	274 (243-361)	0,08826
Neutrofile		2,40-7,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	6,25 (4,14-7,44)	4,00 (3,20-5,58)	0,02332
Limfocyty		0,80-4,00 [$10^3/\mu\text{l}$]	1,2 (0,92-2,15)	1,50 (1,20-1,73)	0,32385
Monocyty		0,16-0,80 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,50 (0,40-0,81)	0,50 (0,37-0,70)	0,83881
Eozynofile		0,04-0,30 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,10 (0,10-0,19)	0,10 (0,05-0,24)	0,86273
Bazofile		0,00-0,10 [$10^3/\mu\text{l}$]	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,57589

p – poziom istotności statystycznej

K- kobiety

M mężczyźni

4.3. Porównanie wyników oznaczeń białek granulocytarnych, wskaźników zapalnych, I-FABP i przeciwciał w badanych grupach oraz ocena ich współzależności

W Tab. 9 porównano analizowane parametry w grupie pacjentów z CD i grupie kontrolnej. Stężenie CRP, laktoferyny, wskaźnik laktoferyna/WBC, stężenie kalprotektyny, wskaźnik kalprotektyna/WBC, stężenie elastazy leukocytarnej, wskaźnik elastaza/WBC były znacząco większe w grupie pacjentów z CD. Mediana stężenia CRP była blisko 6-krotnie większa u pacjentów z CD niż u osób zdrowych. Odpowiednio średnia lub mediana stężenia laktoferyny, kalprotektyny, elastazy leukocytarnej, wskaźnika kalprotektyna/WBC były dwukrotnie większe u pacjentów z CD niż w grupie kontrolnej. Mediany wskaźnika laktoferyna/NEU, kalprotektyna/NEU i elastaza/NEU nie różniły się istotnie w obu grupach.

Tabela 9. Porównanie wyników oznaczeń białek granulocytarnych, wskaźników zapalnych i I-FABP w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i w grupie kontrolnej

		Choroba Leśniowskiego- Crohna	Grupa kontrolna	P
CRP	[mg/l]	6,4 (0,5-20,5)	1,1 (0,51-2,14)	0,02819
Laktoferyna	[ng/ml]	243,2±102,0	129,7±32,7	0,00002
Laktoferyna/ WBC		32,9 (24,0-35,4)	21,9 (17,1-25,2)	0,00833
Laktoferyna/NEU		43,5 (31,7-52,6)	40,0 (32,2-59,2)	0,92457
Kalprotektyna	[ng/ml]	151,6±97,8	69,9±22,1	0,00066
Kalprotektyna/ WBC		20,0 (13,7-25,7)	12,7 (8,4-17,4)	0,00680
Kalprotektyna/NEU		23,4 (16,8-42,6)	19,7 (16,1-33,2)	0,49033
Elastaza	[ng/ml]	64,3±43,1	30,1±7,7	0,00129
Elastaza/WBC		6,7 (5,8-9,2)	5,3 (4,2-6,7)	0,00552
Elastaza / NEU		10,3 (7,2-13,4)	9,9 (7,4-13,2)	0,86043
I-FABP	[pg/ml]	438 (332-534)	572 (469-761)	0,07431
Neopteryna	[nmol/l]	6,8 (5,6-8,9)	6,8 (5,7-8,2)	1,00000

p – poziom istotności statystycznej

W Tab. 10 przedstawiono porównanie badanych parametrów w grupie chorych na UC i w grupie kontrolnej. Stężenie CRP, laktoferyny, wskaźnik laktoferyna/WBC, wskaźnik laktoferyna/NEU, stężenie kalprotektyny, wskaźnik kalprotektyna/WBC i stężenie elastazy leukocytarnej były znacząco większe u pacjentów chorych na UC w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto odpowiednio średnia lub mediana stężenia CRP, laktoferyny, kalprotektyny i elastazy leukocytarnej były u pacjentów z UC dwukrotnie większe. Nie stwierdzono znaczących różnic w średnich/medianach wskaźnika kalprotektyna/NEU, stężenia I-FABP i stężenia neopteryny pomiędzy pacjentami z UC a grupą kontrolną.

W Tab. 11 porównano oceniane parametry u pacjentów z CD i pacjentów z UC – jedynie mediana wskaźnika laktoferyna/NEU i wskaźnika elastaza/NEU były istotnie większe u pacjentów z UC niż u pacjentów z CD.

Tabela 10. Porównanie wyników oznaczeń białek granulocytarnych, wskaźników zapalnych i I-FABP w grupie pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i w grupie kontrolnej

		Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Grupa kontrolna	P
CRP	[mg/l]	2,3 (1,1-19,6)	1,1 (0,51-2,14)	0,01163
Laktoferyna	[ng/ml]	242,6±107,5	129,7±32,7	0,00003
laktoferyna/ WBC		29,9 (24,6-40,7)	21,9 (17,1-25,2)	0,00270
Laktoferyna/NEU		48,6 (42,5-70,3)	40,0 (32,2-59,2)	0,04965
Kalprotektyna	[ng/ml]	149,6±72,3	69,9±22,1	0,00002
Kalprotektyna/ WBC		15,8 (12,9-28,8)	12,7 (8,4-17,4)	0,01025
Kalprotektyna/Neu		23,2 (18,7-51,6)	19,7 (16,1-33,2)	0,06563
Elastaza	[ng/ml]	62,0±30,9	30,1±7,7	0,00004
Elastaza/WBC		8,4 (6,5-9,9)	5,3 (4,2-6,7)	0,00024
Elastaza / NEU		12,8 (10,9-15,9)	9,9 (7,4-13,2)	0,01200
I-FABP	[pg/ml]	429 (329-938)	572 (469-761)	0,39248
Neopteryna	[nmol/l]	7,9 (5,9-11,3)	6,8 (5,7-8,2)	0,10837

p – poziom istotności statystycznej

Tabela 11. Porównanie wyników oznaczeń białek granulocytarnych, wskaźników zapalnych i I-FABP w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego

		Choroba Leśniowskiego- Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	P
CRP	[mg/l]	6,4 (0,5-20,5)	2,26 (1,1 -19,6)	0,95852
Laktoferyna	[ng/ml]	243,2±102,0	242,6±107,5	0,98117
laktoferyna/ WBC		32,9 (24,0-35,4)	29,9 (24,6-40,7)	0,95511
Laktoferyna/NEU		43,5 (31,7-52,6)	48,6 (42,5-70,3)	0,03353
Kalprotektyna	[ng/ml]	151,6±97,8	149,6±72,3	0,95511
Kalprotektyna/ WBC		20,0 (13,7-25,7)	15,8 (12,9-28,8)	0,72953
Kalprotektyna/Neu		23,4 (16,8-42,6)	23,2 (18,7-51,6)	0,33392
Elastaza	[ng/ml]	64,3±43,1	62,0±30,9	0,33392
Elastaza/WBC		6,7 (5,8-9,2)	8,4 (6,5-9,9)	0,33058
Elastaza / NEU		10,3 (7,2-13,4)	12,8 (10,9-15,9)	0,04965
I-FABP	[pg/ml]	438 (332-534)	429 (329-938)	0,71583
Neopteryna	[nmol/l]	6,8 (5,6-8,9)	7,9 (5,9-11,3)	0,08613

p – poziom istotności statystycznej

W Tab. 12 przedstawiono ocenę związku między wynikami badań biochemicznych a logarytmem liczby leukocytów i liczby neutrofilii. Zarówno w CD jak i UC stwierdzono

korelację między laktoferyną a log liczby leukocytów (w CD $r^2=48\%$, w UC $r^2=23\%$), jak i logarytmem liczby neutrofile (w CD $r^2=45\%$, w UC $r^2=20\%$). W grupie pacjentów z UC stwierdzono również korelację pomiędzy kalprotektyną a log liczby leukocytów ($r^2=25\%$) i log liczby neutrofile ($r^2=20\%$) oraz korelację pomiędzy elastazą a log liczby leukocytów ($r^2=22\%$) w UC. Nie stwierdzono natomiast korelacji między kalprotektyną i elastazą a logarytmem liczby leukocytów ani neutrofile w CD.

Tabela 12. Ocena związku pomiędzy wynikami badań biochemicznych a log liczby leukocytów i neutrofile (korelacja Pearsona)

	Grupa kontrolna		Choroba Leśniowskiego-Crohna		Wrzodzące zapalenie jelita grubego	
	Log WBC	Log Neutrofile	Log WBC	Log Neutrofile	Log WBC	Log Neutrofile
Laktoferyna	R=0,2155 p=0,376	R=0,2239 p=0,357	R=0,6941 p=0,001	R=0,6677 p=0,001	R=0,5188 p=0,004	R=0,4494 p=0,014
Kalprotektyna	R=-0,0572 p=0,816	R=0,0348 p=0,888	R=0,3418 p=0,140	R=0,3494 p=0,131	R=0,4964 p=0,006	R=0,4629 p=0,011
Elastaza	R=0,3069 p=0,201	R=0,3069 p=0,201	R=0,3952 p=0,085	R=0,3247 p=0,162	R=0,4723 p=0,010	R=0,3626 p=0,053
log neopteryna	R=0,1737 p=0,477	R=0,0450 p=0,855	R=0,1385 p=0,560	R=0,1905 p=0,421	R=0,3366 p=0,074	R=0,3191 p=0,092
log I-FABP	R=0,0171 p=0,945	R=0,0372 p=0,880	R=0,0033 p=0,989	R=-0,0234 p=0,922	R=-0,3016 p=0,112	R=-0,2504 p=0,190

p – poziom istotności statystycznej
R – współczynnik korelacji pearsona

Przeprowadzono też ocenę korelacji pomiędzy wynikami badań w grupie kontrolnej (Tab. 13), w grupie pacjentów z CD (Tab. 14) oraz grupie pacjentów z UC (Tab. 15). We wszystkich grupach stwierdzono korelację pomiędzy laktoferyną, a kalprotektyną (grupa kontrolna $r^2=22\%$, CD $r^2=40\%$, UC $r^2=34\%$), laktoferyną a elastazą leukocytarną (grupa kontrolna $r^2=30\%$, CD $r^2=52\%$, UC $r^2=13\%$) oraz kalprotektyną a elastazą leukocytarną (grupa kontrolna $r^2=31\%$, CD $r^2=51\%$, UC $r^2=35\%$). W grupie kontrolnej (Tab. 13) stwierdzono także korelację pomiędzy log stężenia neopteryny a laktoferyną ($r^2=24\%$). W grupie pacjentów chorych na UC (Tab 14) stwierdzono ujemną korelację pomiędzy kalprotektyną a log stężenia I-FABP ($r^2=16\%$).

Tabela 13. Współzależność między wynikami badań w grupie kontrolnej (korelacja Pearsona)

	Laktoferyna	Kalprotektyna	Elastaza	log I-FABP	log neopteryna
Laktoferyna		R=0,4644 p=0,045	R=0,5507 p=0,015	R=0,0435 p=0,860	R=0,4865 p=0,035
Kalprotektyna	R=0,4644 p=0,045		R=0,5565 p=0,013	R=0,0211 p=0,932	R=-0,0714 p=0,771
Elastaza	R=0,5507 p=0,015	R=0,5565 p=0,013		R=0,1598 p=0,513	R=0,1754 p=0,473
log I-FABP	R=0,0435 p=0,860	R=0,0211 p=0,932	R=0,1598 p=0,513		R=0,2456 p=0,311
log neopteryna	R=0,4865 p=0,035	R=-0,0714 p=0,771	R=0,1754 p=0,473	R=0,2456 p=0,311	

p – poziom istotności statystycznej
R-współczynnik korelacji pearsona

Tabela 14. Współzależność między wynikami badań w grupie z chorobą Leśniowskiego-Crohna (korelacja Pearsona)

	Laktoferyna	Kalprotektyna	Elastaza	log I-FABP	log neopteryna
Laktoferyna		R=0,6341 p=0,000	R=0,7180 p=0,000	R=-0,1959 p=0,327	R=0,2778 p=0,161
Kalprotektyna	R=0,6341 p=0,000		R=0,7148 p=0,000	R=-0,3243 p=0,099	R=0,2759 p=0,164
Elastaza	R=0,7180 p=0,000	R=0,7148 p=0,000		R=-0,0122 p=0,952	R=0,3567 p=0,068
log I-FABP	R=-0,1959 p=0,327	R=-0,3243 p=0,099	R=-0,0122 p=0,952		R=0,3795 p=0,051
log neopteryna	R=0,2778 p=0,161	R=0,2759 p=0,164	R=0,3567 p=0,068	R=0,3795 p=0,051	

p – poziom istotności statystycznej
R-współczynnik korelacji pearsona

Tabela 15. Współzależność między wynikami badań w grupie z wrzodziejącym Zapaleniem Jelita grubego (korelacja Pearsona)

	laktoferyna	Kalprotektyna	Elastaza	log I-FABP	log neopteryna
Laktoferyna		R=04945 p=0,003	R=03541 p=0,043	R=-0,3266 p=0,064	R=00454 p=0,802
Kalprotektyna	R=04945 p=0,003		R=05887 p=0,000	R=-0,4014 p=0,021	R=01503 p=0,404
Elastaza	R=03541 p=0,043	R=05887 p=0,000		R=-0,1037 p=0,566	R=03349 p=0,057
log I-FABP	R=-0,3266 p=0,064	R=-0,4014 p=0,021	R=-0,1037 p=0,566		R=-0,2260 p=0,206
log neopteryna	R=00454 p=0,802	R=01503 p=0,404	R=03349 p=0,057	R=-0,2260 p=0,206	

p – poziom istotności statystycznej

R-współczynnik korelacji pearsona

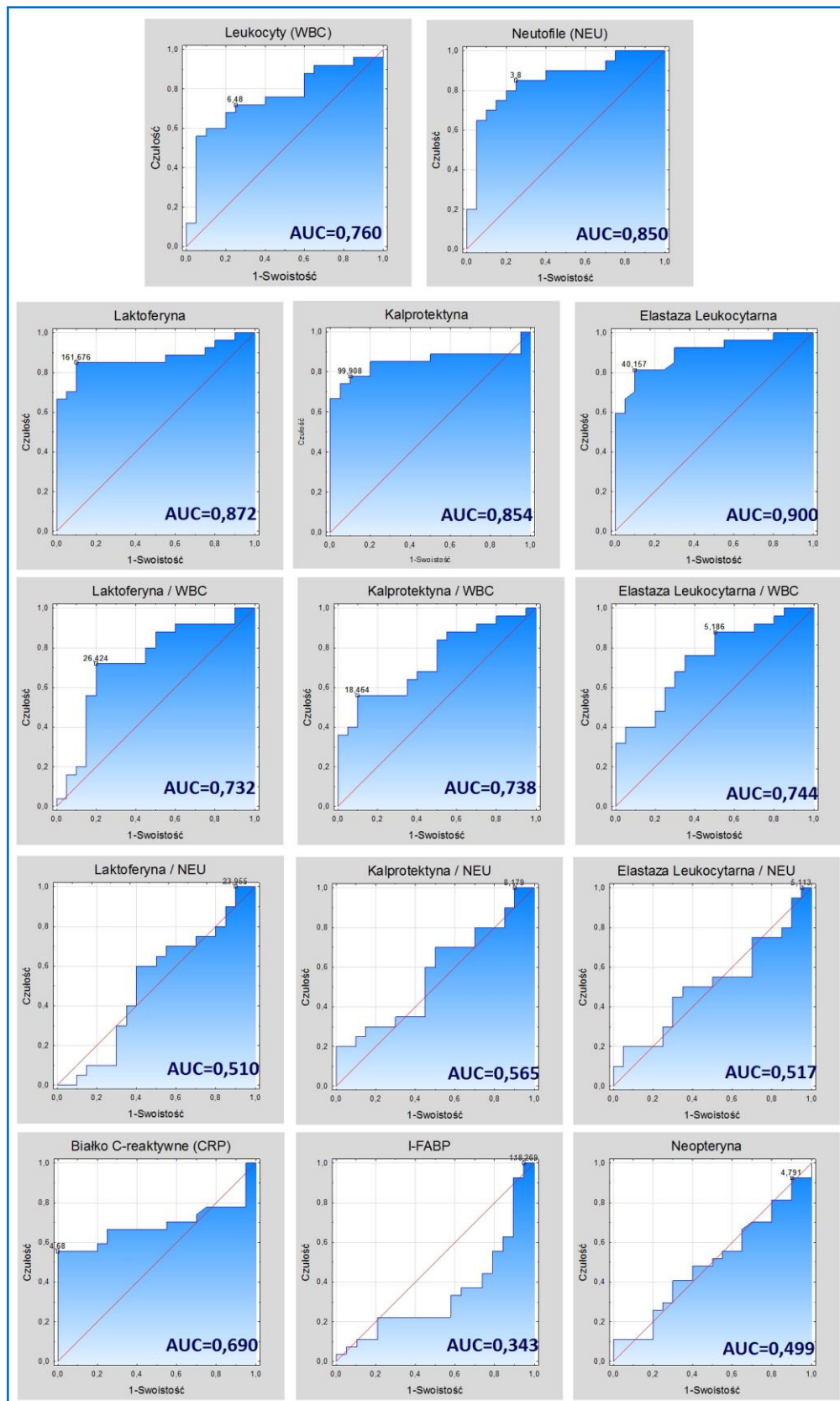
4.4. Ocena użyteczności diagnostycznej ocenianych badań

Na Ryc. 7 przedstawiono krzywe ROC dla ocenianych badań u pacjentów chorych na CD i w grupie kontrolnej. Największe pola pod krzywą ROC (AUC) stwierdzono dla liczby neutrofilii, stężenia kalprotektyny, laktoferyny i elastazy leukocytarnej (największe pole pod krzywą, równe 0,900). Dla wskaźników białka granulocytarne/WBC stwierdzono pola pod krzywą poniżej 0,800, a dla wskaźników białka granulocytarne/NEU - poniżej 0,600. AUC dla białka C-reaktywnego wynosiło 0,700. Niewielkie pola pod krzywą stwierdzono również dla I-FABP oraz neopteryny.

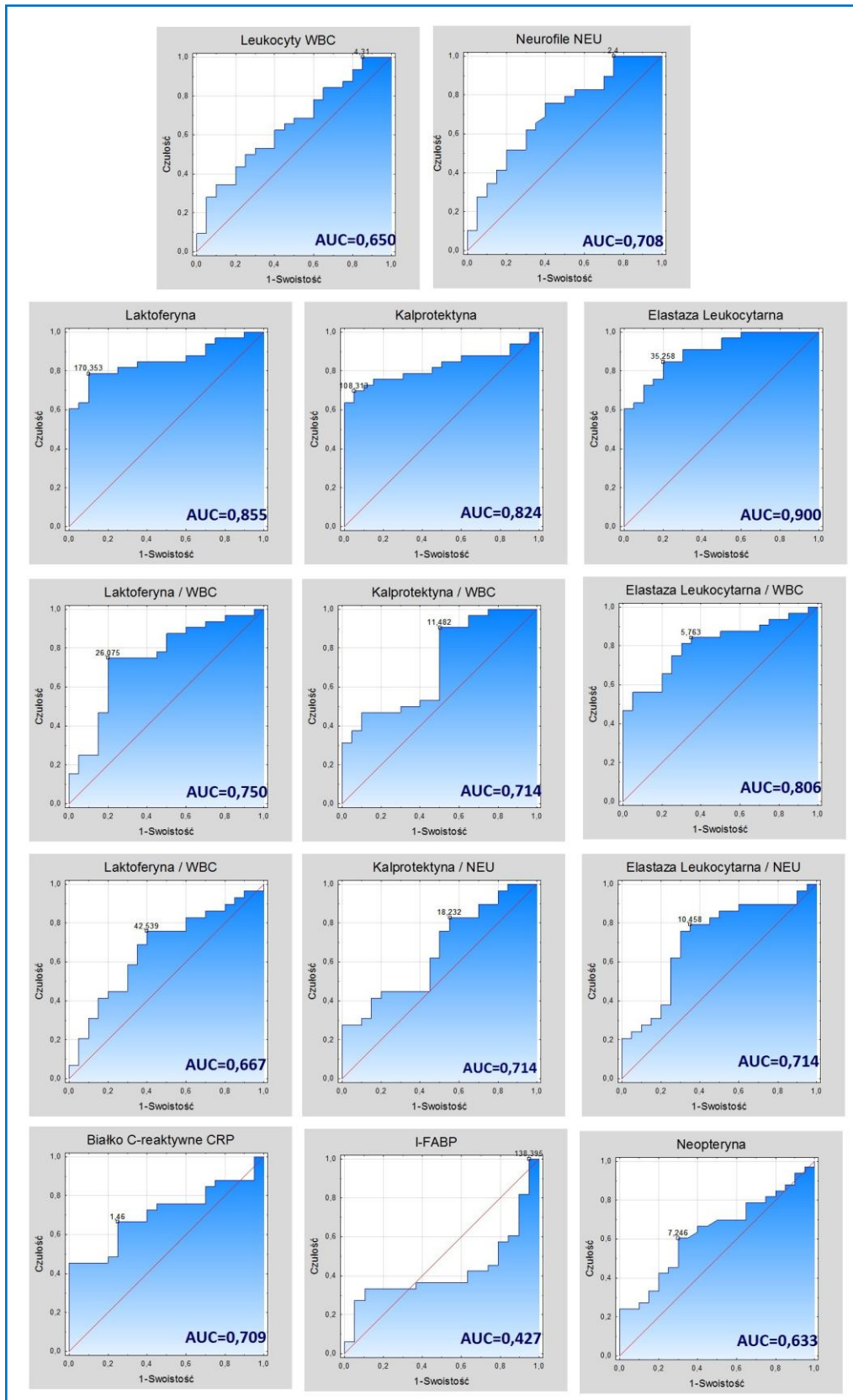
W Tab. 16 przedstawiono charakterystykę diagnostyczną ocenianych badań u pacjentów z CD i w grupie kontrolnej. Dużą dokładnością, czułością, swoistością, wartościami predykcyjnymi wyników oraz ilorazem prawdopodobieństw (LR+) charakteryzowały się laktoferyna, kalprotektyna i elastaza leukocytarne. Dużą dokładnością, czułością oraz wartością predykcyjną wyniku ujemnego cechowała się liczba neutrofilii. Wskaźniki białka granulocytarne/WBC cechowały się dokładnością na poziomie 70% i małą czułością oraz LR+. Dużą wartość predykcyjną wyniku dodatniego stwierdzono tylko dla wskaźników laktoferyna/WBC i kalprotektyna/WBC. Dla wskaźników białka granulocytarne/NEU stwierdzono niewielką dokładność (ok. 50%), dużą czułość i wartość predykcyjną wyniku ujemnego.

Na Ryc. 8 przedstawiono krzywe ROC dla ocenianych badań u pacjentów chorych na UC i w grupie kontrolnej. Największe pola pod krzywą stwierdzono dla liczby neutrofilii, stężenia kalprotektyny, laktoferyny i elastazy leukocytarnej (pole pod krzywą równe 0,900). Dla wskaźników białka granulocytarne/WBC stwierdzono pola pod krzywą między 0,700 a 0,800, natomiast dla wskaźników białka granulocytarne/NEU - poniżej 0,700. AUC dla CRP było równe 0,650. Niewielkie pola pod krzywą ROC stwierdzono dla I-FABP i neopteryny.

W Tab. 17 przedstawiono charakterystykę diagnostyczną ocenianych badań u pacjentów z UC i w grupie kontrolnej. Dużą dokładnością czułością, swoistością i wartościami predykcyjnymi wyników charakteryzowały się laktoferyna, kalprotektyna i elastaza leukocytarne, największą wartość LR+ stwierdzono dla kalprotektyny.



Rycina 7. Krzywe ROC dla liczby leukocytów i neutrofilii, stężenia białek granulocytarnych, CRP, I-FABP i neopteryny oraz wyliczonych wskaźników w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i w grupie kontrolnej (AUC-pole pod krzywą)



Rycina 8. Krzywe ROC dla liczby leukocytów i neutrofilii, stężenia białek granulocytarnych, CRP, I-FABP i neopteryny oraz wyliczonych wskaźników w grupie pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i w grupie kontrolnej (AUC-pole pod krzywą)

Tabela 16. Charakterystyka diagnostyczna ocenianych badań w rozpoznawaniu choroby Leśniowskiego-Crohna

Parametry	wartość odcięcia	Dokładność (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV %	NPV %	LR+
CRP [mg/l]	4,7	48,5	80,0	60,4	70,0	48,5	2,31
WBC [10^3 /ul]	6,5	73,3	72,0	75,0	78,3	68,2	2,88
Neutrofile [10^3 /ul]	3,8	80,0	85,0	75,0	77,3	83,3	3,40
Laktoferyna [ng/ml]	161,7	87,2	85,2	90,0	92,0	81,8	8,52
Laktoferyna/WBC	26,6	73,3	68,0	80,0	81,0	66,7	3,40
Laktoferyna/NEU	23,9	55,0	100,0	10,0	52,6	100,0	1,11
Kalprotektyna [ng/ml]	99,1	83,0	77,8	90,0	91,3	75,0	7,78
Kalprotektyna/WBC	18,5	71,1	56,0	90,0	87,5	62,1	5,60
Kalprotektyna/ NEU	8,2	55,0	100,0	10,0	52,6	100,0	1,11
Elastaza [ng/ml]	40,1	85,1	81,5	90,0	91,7	78,3	8,15
Elastaza/WBC	5,2	71,1	88,0	50,0	68,8	76,9	1,76
Elastaza/ NEU	5,1	52,5	100,0	5,0	51,3	100,0	1,05
I-FABP [pg/ml]	118,3	60,9	100,0%	5,3%	60,0%	100,0	1,06
Neopteryna [nmol/l]	4,8	57,4	92,6%	10,0%	58,1%	50,0	1,03

PPV-wartość predykcyjna wyniku dodatniego

NPV- wartość predykcyjna wyniku ujemnego

LR+- iloraz prawdopodobieństw dla wyniku dodatniego

Tabela 17. Charakterystyka diagnostyczna ocenianych badań w rozpoznawaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

	Punkt odcięcia	Dokładność (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)	LR+
CRP [mg/l]	3,0	48,5	80,0	60,4	80,0	48,5	2,42
WBC [10^3 /ul]	5,1	81,3	35,0	63,5	66,7	53,8	1,25
Neutrofile [10^3 /ul]	3,0	79,3	45,0	65,3	67,6	60,0	1,44
Laktoferyna [ng/ml]	170,4	78,8	90,0	83,0	92,9	72,0	7,88
Laktoferyna/WBC	26,1	75,0	80,0	76,9	85,7	66,7	3,75
Laktoferyna/NEU	42,5	75,9	60,0	69,4	73,3	63,2	1,90
Kalprotektyna [ng/ml]	108,3	69,7	95,0	79,2	95,8	65,5	13,94
Kalprotektyna/WBC	11,5	90,6	50,0	75,0	74,4	76,9	1,81
Kalprotektyna/ NEU	18,2	82,8	45,0	67,3	68,6	64,3	1,50
Elastaza [ng/ml]	35,3	84,8	80,0	83,0	87,5	76,2	4,24
Elastaza/WBC	5,8	81,3	65,0	75,0	78,8	68,4	2,32
Elastaza/ NEU	10,5	79,3	65,0	73,5	76,7	68,4	2,27
I-FABP [pg/ml]	277,4	81,8	10,5	55,8	61,4	25,0	0,91
Neopteryna [nmol/l]	7,2	60,6	70,0	64,2	76,9	51,9	2,02

PPV-wartość predykcyjna wyniku dodatniego

NPV- wartość predykcyjna wyniku ujemnego

LR+- iloraz prawdopodobieństw dla wyniku dodatniego

4.5. Zastosowanie ocenianych badań w ocenie aktywności klinicznej nieswoistych zapaleń jelit

4.5.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna

W Tab. 18 porównano wyniki ocenianych badań i wyliczone wskaźniki u pacjentów z zaostrzeniem i remisją CD – z aktywnością kliniczną określoną na podstawie CDAI. U pacjentów z zaostrzeniem choroby stwierdzono istotnie większe stężenie CRP, laktoferyny i kalprotektyny. Mediana stężenia CRP była 10-krotnie większa, a średnie stężenie laktoferyny i kalprotektyny prawie dwukrotnie większe w porównaniu z pacjentami w remisji. Znamienność różnic nie występowała w przypadku wskaźników kalprotektyna, laktoferyna / WBC, NEU.

Tabela 18. Porównanie wyników ocenianych badań i wyliczonych wskaźników u pacjentów z zaostrzeniem i remisją choroby Leśniowskiego-Crohna na podstawie CDAI

		Remisja CDAI<220 n=9	Zaostrzenie, CDAI≥220 n=18	p
CRP	[mg/l]	1,60 (0,13-6,41)	16,41 (1,73-24,04)	0,02386
WBC	[10 ³ /ul]	7,6 (5,2-9,5)	8,8 (6,5-10,0)	0,43161
Neutrofile	[10 ³ /ul]	5,1 (3,8-7,0)	6,5 (4,7-7,6)	0,43331
Laktoferyna	[ng/ml]	186,3±45,2	276,7±112,0	0,02302
Laktoferyna/ WBC		24,0 (17,2-35,3)	33,2 (28,7-38,8)	0,12265
Laktoferyna/NEU		32,5 (24,9-47,3)	44,2 (41,0-54,3)	0,14892
Kalprotektyna	[ng/ml]	90,6±42,0	187,5±104,2	0,00986
Kalprotektyna/ WBC		13,8 (9,9-21,4)	21,9 (15,5-31,3)	0,05832
Kalprotektyna/NEU		17,7 (14,3-24,8=)	25,9 (19,8-50,7)	0,12705
Elastaza	[ng/ml]	50,8±12,9	72,2±53,5	0,22767
Elastaza/WBC		6,9932	6,7 (5,5-9,2)	0,93037
Elastaza / NEU		10,6 (5,8-9,1)	9,3 (6,8-16,9)	0,96711
I-FABP	[pg/ml]	489 (373-768)	422 (332-522)	0,46659
Neopteryna	[nmol/l]	5,9 (4,8-7,0)	7,4 (5,8-9,0)	0,08323

p – poziom istotności statystycznej

W Tab. 19 przedstawiono ocenę związku wyników badań i wyliczonych wskaźników z aktywnością kliniczną CD. Wzrost stężenia CRP zwiększał o 15% szansę wystąpienia zaostrzenia. Stężenie laktoferyny i kalprotektyny w niewielkim stopniu wpływały na szansę wystąpienia zaostrzenia (wzrost odpowiednio o 1,4% i 3,5%). Dla pozostałych parametrów nie zaobserwowano związku z aktywnością kliniczną CD.

Tabela 19. Ocena związku wyników badań i wyliczonych wskaźników z aktywnością kliniczną choroby Leśniowskiego-Crohna przy pomocy regresji logistycznej

		iloraz szans	95% Przedział ufności	p
CRP	[mg/l]	1,148	1,012-1,303	0,033
WBC	[10 ³ /ul]	1,123	0,777-1,622	0,537
Neutrofile	[10 ³ /ul]	1,190	0,729-1,943	0,486
Laktoferyna	[ng/ml]	1,014	1,000-1,028	0,045
Laktoferyna/WBC		1,103	0,987-1,232	0,083
Laktoferyna/NEU		1,077	0,977-1,187	0,136
Kalprotektyna	[ng/ml]	1,035	1,005-1,066	0,022
Kalprotektyna/WBC		1,122	0,992-1,270	0,066
Kalprotektyna/NEU		1,065	0,974-1,165	0,165
Elastaza	[ng/ml]	1,018	0,987-1,049	0,259
Elastaza/WBC		1,057	0,851-1,314	0,617
Elastaza/ NEU		1,053	0,886-1,251	0,556
I-FABP	[pg/ml]	1,000	0,999-1,002	0,626
Neopteryna	[nmol/l]	1,528	0,930-2,510	0,094

p – poziom istotności statystycznej

4.5.2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

W Tab. 20 porównano wyniki ocenianych badań i wyliczone wskaźniki u pacjentów z zaostrzeniem i remisją UC – z aktywnością kliniczną określoną na podstawie indeksu Truelove-Wittsa. U pacjentów z zaostrzeniem stwierdzono znamienne większe stężenie CRP, liczbę leukocytów i liczbę neutrofilek. Mediana stężenia CRP była u pacjentów z zaostrzeniem prawie 14-krotnie większa w porównaniu z pacjentami w remisji.

W Tab. 21 przedstawiono ocenę związku wyników badań i wyliczonych wskaźników z aktywnością kliniczną UC. Zmiana żadnego z ocenianych wyników badań ani wskaźników nie zwiększała istotnie szansy zaostrzenia.

Tabela 20 Porównanie wyników ocenianych badań i wyliczonych wskaźników u pacjentów z zaostrzeniem i remisją wrzodziejącego zapalenie jelita grubego wg kryteria Truelove-Wittsa

		Remisja n=10	Zaostrzenie n=23	p
CRP	[mg/l]	0,87 (0,49-1,87)	12,70 (1,37-26,19)	0,02487
WBC	[10 ³ /ul]	5,3 (4,6-6,4)	7,2 (5,8-9,1)	0,02930
NEU	[10 ³ /ul]	3,3(2,6-3,5)	4,2 (3,5-5,9)	0,02480
Laktoferyna	[ng/ml]	199,8±72,0	258,6±115,3	0,16512
laktoferyna/ WBC		29,9 (23,2-43,5)	30,0 (26,1-37,4)	0,83401
Laktoferyna/NEU		57,9 (40,6-81,2)	47,9 (42,5-65,0)	0,51007
Kalprotektyna	[ng/ml]	113,2±72,8	163,3±68,6	0,07571
Kalprotektyna/ WBC		13,0 (11,9-17,0)	18,6 (13,5-30,7)	0,31446
Kalprotektyna/ NEU		21,9 (20,5-43,1)	35,2 (18,3-51,6)	0,90291
Elastaza	[ng/ml]	47,0±21,6	67,6±32,3	0,08707
Elastaza/WBC		8,3 (7,0-9,2)	8,9 (6,4-10,1)	0,86686
Elastaza / NEU		13,2 (11,5-15,2)	12,8 (10,1-16,6)	0,78841
I-FABP	[pg/ml]	705 (347-938)	429 (300-931)	0,55779
Neopteryna	[nmol/l]	6,3 (5,4-8,7)	8,1 (7,01-14,9)	0,07205

p – poziom istotności statystycznej

Tabela 21 . Ocena związku wyników badań i wyliczonych wskaźników z aktywnością kliniczną wrzodziejącego zapalenie jelita grubego przy pomocy regresji logistycznej

		Iloraz szans	95% Przedział Ufności	p
CRP	[mg/l]	1,011	1,002-1,218	0,049
WBC	[10 ³ /ul]	1,560	0,925-2,632	0,095
Neutrofile	[10 ³ /ul]	1,970	0,828-4,690	0,125
Laktoferyna	[ng/ml]	1,007	0,997-1,017	0,171
Laktoferyna/WBC		0,995	0,951-1,042	0,846
Laktoferyna/ NEU		0,994	0,968-1,021	0,666
Kalprotektyna	[ng/ml]	1,011	0,998-1,024	0,086
Kalprotektyna/WBC		1,010	0,940-1,085	0,785
Kalprotektyna/Neu		1,004	0,962-1,048	0,847
Elastaza	[ng/ml]	1,035	0,993-1,079	0,108
Elastaza/WBC		1,035	0,837-1,279	0,753
Elastaza/ NEU		1,035	0,837-1,279	0,753
I-FABP	[pg/ml]	1,000	0,999-1,001	0,407
Neopteryna	[nmol/l]	1,236	0,928-1,647	0,147

p – poziom istotności statystycznej

4.6 Występowanie przeciwciał w badanych grupach

W Tab. 22 porównano występowanie wybranych przeciwciał: ASCA, ANCA, GP2 CUZD1, GAB oraz LFS w grupie pacjentów z CD, UC oraz w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono występowania badanych przeciwciał w grupie kontrolnej z wyjątkiem dwóch osób, u których wykryto ANCA. . Największą częstość występowania w CD stwierdzono dla przeciwciał ASCA i CUZD1, a w UC – dla przeciwciał ANCA i GAB. Pozostałe przeciwciała w tych grupach pacjentów występowały z częstością poniżej 10%.

Tabela 22. Porównanie częstości występowania przeciwciał między badanymi grupami

	Choroba Leśniowskiego-Crohna		Wrzodziejące zapalenie jelita grubego		Grupa Kontrolna	
	N	%	N	%	N	%
ASCA	18	66,7	0	0,0	0	0,0
CUZD1	4	14,8	1	3,0	0	0,0
GP2	1	3,7	3	9,1	0	0,0
pANCA	2	7,4	15	45,5	2	10,0
GAB	0	0,0	9	27,3	0	0,0
LFS	1	3,7	2	6,1	0	0,0

CUZD1 – przeciwciała przeciw glikoproteinie CUZD1

GP2 przeciwciała przeciw glikoproteinie 2

ANCA- przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii

ASCA- przeciwciała przeciw ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*

GAB – przeciwciała przeciw komórkę kubkowym jelita

LFS- przeciwciała przeciw laktoferynie związanej z DNA

W Tab. 23 porównano występowanie przeciwciał oraz paneli przeciwciał charakterystycznych dla CD u pacjentów z CD i UC. Wykazano, że ASCA i panel przeciwciał ASCA+ i ANCA- oraz ASCA+ i ANCA- i/lub CUZD1 i/lub GP2 występowały u znamienne większego odsetka pacjentów z CD niż pacjentów z UC. Ponadto, przy zastosowaniu panelu złożonego z większej ilości przeciwciał wzrastał odsetek pacjentów z CD z wynikiem dodatnim.

Tabela 23. Porównanie występowania paneli przeciwciał specyficznych dla Choroby Leśniowskiego-Crohna w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

	Choroba Leśniowskiego-Crohna (% pacjentów)	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (% pacjentów)	P
CUZD 1	15,4	3,0	0,08548
GP2	7,7	3,0	0,41865
ASCA	66,7	0,0	0,00000
CUZD1 i/lub GP2	22,2	12,1	0,29709
ASCA+, ANCA-	63,0	0,0	0,00000
ASCA+,ANCA- i/lub CUZD1 i/lub GP2	74,1	12,1	0,00000

p – poziom istotności statystycznej

CUZD1 – przeciwciała przeciw glikoproteinie CUZD1

GP2 przeciwciała przeciw glikoproteinie 2

ANCA- przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii

ASCA- przeciwciała przeciw ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*

W Tab. 24 porównano występowanie przeciwciał oraz paneli przeciwciał charakterystycznych dla UC u pacjentów z CD i UC. Wykazano, że ANCA, panel przeciwciał ASCA- i ANCA+ oraz ASCA- i ANCA+ i/lub GAB i/lub LFS występowały u znamienne większego odsetka pacjentów z UC niż pacjentów z CD. Ponadto przy zastosowaniu panelu złożonego z większej ilości przeciwciał wzrastał odsetek pacjentów z UC z wynikiem dodatnim.

Tabela 24. Porównanie występowania paneli przeciwciał charakterystycznych dla wrzodziejącego zapalenie jelita grubego u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

	Choroba Leśniowskiego- Crohna (% pacjentów)	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (% pacjentów)	P
GAB	12,1	3,8	0,25718
ANCA	7,4	45,5	0,00059
LFS	3,7	6,1	0,67314
GAB i/lub LFS	7,4	18,2	0,21036
ANCA+, ASCA-	3,7	45,5	0,00008
ANCA+, ASCA- i/lub GAB i/lub LFS	11,1	48,5	0,00128

p – poziom istotności statystycznej

ANCA- przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii

ASCA- przeciwciała przeciw ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*

GAB – przeciwciała przeciw komórką kubkowym jelita

LFS- przeciwciała przeciw laktoferynie związanej z DNA

4.7 Ocena użyteczności diagnostycznej paneli przeciwciał

W Tab. 25 przedstawiono charakterystykę diagnostyczną badanych przeciwciał i paneli przeciwciał typowych dla CD. W rozpoznawaniu CD wszystkie przeciwciała i panele cechowały się małą czułością diagnostyczną i swoistością diagnostyczną równą 100%. PPV równą 100% stwierdzono dla CUZD1 i GP2 oraz panelu złożonego z tych dwóch przeciwciał. Największą NPV, ok. 70%, stwierdzono dla ASCA oraz paneli ASCA+, ANCA- i ASCA+, ANCA- i/lub CUZD1 i/lub GP2.

Tabela 25. Charakterystyka diagnostyczna przeciwciał i paneli przeciwciał w rozpoznawaniu choroby Leśniowskiego-Crohna

	Dokładność (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)
ASCA	80,9	66,7	100,0	47,4	69,0
CUZD1	52,2	15,4	100,0	100,0	47,6
GP2	47,8	7,7	100,0	100,0	45,5
ASCA+, ANCA-	78,7	63,0	100,0	62,9	66,7
CUZD1 i/lub GP2	55,3	22,2	100,0	100,0	48,8
ASCA+, ANCA- i/lub CUZD1 i/lub GP2	85,1	74,1	100,0	50,0	74,1

PPV-wartość predykcyjna wyniku dodatniego

NPV- wartość predykcyjna wyniku ujemnego

CUZD1 – przeciwciała przeciw glikoproteinie CUZD1

GP2 przeciwciała przeciw glikoproteinie 2

ANCA- przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii

ASCA- przeciwciała przeciw ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*

W Tab. 26 przedstawiono charakterystykę diagnostyczną badanych przeciwciał i paneli przeciwciał charakterystycznych dla UC. W rozpoznawaniu UC wszystkie przeciwciała i panele cechują się małą czułością diagnostyczną, a dużą swoistością i PPV. NPV ok. 70% stwierdzono jedynie dla panelu przeciwciał ANCA+, ASCA- i/lub GAB i/lub LFS.

Tabela 26. Charakterystyka diagnostyczna przeciwciał i paneli przeciwciał w rozpoznawaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

	Dokładność (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)
ANCA	62,3	54,6	90,0	88,2	50,0
GAB	44,2	12,1	100,0	100,0	39,6
LFS	41,5	6,1	100,0	100,0	39,2
ANCA,ASCA	45,5	54,6	90,0	88,2	50,0
GAB + LFS	49,1	18,2	100,0	100,0	42,6
ANCA+, ASCA- i/lub GAB i/lub LFS	64,2	75,8	90,0	92,6	69,2

PPV-wartość predykcyjna wyniku dodatniego

NPV- wartość predykcyjna wyniku ujemnego

ANCA- przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii

ASCA- przeciwciała przeciw ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*

GAB – przeciwciała przeciw komórkę kubkowym jelita

LFS- przeciwciała przeciw laktoferynie związanej z DNA

5. DYSKUSJA

IBD są chorobami o dużej częstości występowania, a w ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowalności (6; 5; 7). Zapadalność na CD w Europie wynosi obecnie 12,7:100 000 osób, a na UC 24,3:100 000 osób (5). W Polsce, według danych z początku 2014. w Krajowym Rejestrze znajduje się 5191 osób z CD (2), brakuje natomiast danych na temat liczebności pacjentów z UC.

Patomechanizm IBD nie został do końca wyjaśniony. Obecnie zakłada się, że u podstaw rozwoju IBD leży nieprawidłowa odpowiedź śluzówkowego układu limfoidalnego (GALT) na komensalną florę jelitową oraz udział receptora TLR4 w połączeniach ścisłych komórek błony śluzowej, prowadzący do „rozszerzenia” błony śluzowej, napływu komórek zapalnych oraz odsłonięcia miejsc antygenowych, co powoduje przewlekłe zapalenie u osób predysponowanych genetycznie (44; 45; 47).

Diagnoza IBD wymaga łącznego rozważenia wyników badania podmiotowego i przedmiotowego oraz badań pomocniczych, a kluczową rolę odgrywa endoskopia z oceną histopatologiczną (105; 104). Badania radiologiczne oraz endoskopowe wykorzystywane w diagnostyce IBD są inwazyjne, czasochłonne oraz kosztowne (132). Ostatnie dane wskazują, że od wystąpienia objawów do rozpoznania właściwej IBD mija średnio 3 lata (89). Co więcej, w około 5-15% przypadków trudno jest postawić rozpoznanie w oparciu o obraz kliniczny oraz badania obrazowe i histopatologiczne (133). Te trudności diagnostyczne są przyczyną poszukiwania nowych badań, w tym laboratoryjnych, które mogłyby służyć do rozpoznawania, oceny aktywności, rokowania i monitorowania leczenia IBD.

W badaniach histologicznych materiału od chorych z UC stwierdza się obecność nacieków zapalnych złożonych z neutrofilów w obrębie blaszki właściwej błony śluzowej oraz nadmierne tworzenie krypt, natomiast u chorych z CD – obecność nacieków zapalnych złożonych z limfocytów i neutrofilów, przekraczających blaszkę graniczną błony śluzowej i obejmujących warstwę podśluzówkową jelita (3; 49; 105; 106). Wykazana w modelach *in vitro* migracja neutrofilów przez nabłonek jelita jest najprawdopodobniej związana z wydzielaniem przez komórki nabłonkowe jelita chemokin typu CXC, inicjalizujących napływ neutrofilów przez receptor dla tych chemokin na ich powierzchni. Interleukina 8 należąca do rodziny CXC jest najszybciej wydzielaną chemokiną przez komórki nabłonka jelita w odpowiedzi na stymulację bakteriami. Wykazano także, że IL-8 jest chemokiną, która powoduje migrację neutrofilów i naciekanie przez nie tkanek w wielu chorobach, w tym między

innymi w UC i łuszczycy (49). Stwierdzono również, że w 90% komórek nabłonkowych jelita u chorych na IBD zwiększona jest zawartość ENA-78 – nabłonkowego peptydu aktywującego neutrofile (57).

Pobudzone neutrofile wydzielają obecne w ich cytoplazmie enzymy proteolityczne, jak elastaza leukocytarna oraz białka o działaniu przeciwbakteryjnym, jak kalprotektyna i laktoferyna. W świetle danych wskazujących na udział neutrofilii w patogenezie IBD i ich obecności w naciekach zapalnych ściany jelit, białka granulocytarne, podobnie jak wskaźniki zapalne (liczba leukocytów/neutrofilii, CRP, neopteryna) mogą znaleźć zastosowanie w rozpoznawaniu, różnicowaniu i monitorowaniu przebiegu CD i UC, co było przedmiotem badań prezentowanych w niniejszej pracy.

Stężenie CRP, czułego nieswoistego wskaźnika zapalenia, służy do rutynowej oceny aktywności klinicznej i monitorowania leczenia IBD (105). W warunkach fizjologicznych CRP jest wytwarzane przez hepatocyty, które w odpowiedzi na takie bodźce jak uraz lub infekcja, pod wpływem IL-6, TNF- α i IL-1 β szybko zwiększają syntezę i uwalnianie tego białka, które może osiągnąć w surowicy stężenie rzędu 350-400 mg/l (118).

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano zwiększone stężenie CRP u pacjentów z CD (Tab. 9) oraz UC (Tab. 10) w porównaniu do grupy kontrolnej. Mediana stężenia CRP wskazywała na małą/umiarkowaną aktywność procesu zapalnego w przebiegu tych chorób. Chociaż stężenie CRP było u pacjentów z CD większe niż u pacjentów z UC, różnica ta nie była znamienna statystycznie, co wyklucza przydatność tego badania w różnicowaniu CD i UC. (Tab. 11). Publikowane dane wskazują na różnorodny wzrost stężenia CRP w odpowiedzi na stan zapalny w przebiegu CD i UC. U pacjentów chorych na UC część badaczy stwierdzała umiarkowany lub brak wzrostu stężenia CRP pomimo stanu zapalnego (118), co jest zgodne z wynikami w niniejszej pracy. Zwiększone stężenie CRP u pacjentów z CD może mieć również związek z wariantem T300A genu *ATG16L1* kodującego białko 16-1 – składnik kompleksu uczestniczącego w autofagii – ten wariant zmienia wydzielanie cytokin zapalnych i predysponuje do CD. Platinga i wsp. wykazali w badaniach *in vitro*, że wybiórcze pobudzenie wewnątrzkomórkowego receptora NOD2 przez antygeny bakteryjne zwiększa wydzielanie cytokin prozapalnych IL-1 β i IL-6. Polimorfizm genów *NOD2/CARD15* i *ATG16L1* zostały wcześniej opisane, jako częściej występujące u pacjentów z CD (134).

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono dla CRP niewielką czułość i swoistość diagnostyczną, małe wartości predykcyjne wyników i ilorazu prawdopodobieństw LR+, co razem z małym polem pod krzywą ROC (0,690 w CD i 0,709 w UC) wskazuje na małą

użyteczność tego badania w rozpoznawaniu CD i UC (Ryc.7 i 8, Tab. 16 i 17). Podwyższone stężenie CRP wydaje się natomiast być dobrym wskaźnikiem aktywności klinicznej CD i UC (Tab. 18 i 20) oraz predyktorem zaostrzenia CD (Tab. 19). Podobne wnioski zostały wyciągnięte przez Lehrke i wsp., którzy przeprowadzili badanie 239 pacjentów z CD, 114 chorych na UC oraz 144 osób zdrowych i stwierdzili większe stężenie CRP u pacjentów w remisji CD oraz UC w porównaniu do grupy kontrolnej, nie obserwując różnic w stężeniu CRP między pacjentami z CD i z UC. Autorzy ci wyznaczyli punkt odcięcia stężenia CRP wynoszący 5 mg/l, przy którym czułość diagnostyczna wynosiła 70%. Choć zwiększone stężenie CRP nie pozwalało rozpoznać wszystkich przypadków IBD, żaden pacjent cierpiący na czynnościowe zaburzenia jelit nie miał podwyższonego stężenia CRP w surowicy (135).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znamienne większe stężenie ocenianych białek granulocytarnych u pacjentów z CD i UC w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 9 i 10). W ocenie użyteczności diagnostycznej tych oznaczeń największe pole pod krzywą ROC stwierdzono dla elastazy leukocytarnej (Ryc. 7 i 8). U pacjentów z CD, stwierdzono dla elastazy leukocytarnej przy punkcie odcięcia 40 ng/ml czułość, swoistość i wartość predykcyjną wyniku dodatniego ponad 80%, z wartością predykcyjną wyniku ujemnego bliską 80% (Tab. 16). U pacjentów z UC przy punkcie odcięcia 35,3 ng/ml, elastaza leukocyta miała podobną charakterystykę diagnostyczną (Tab. 17). Duże pole pod krzywą ROC w rozpoznawaniu CD (Ryc. 7) i UC (Ryc. 8) stwierdzono także dla laktoferyny i kalprotektyny. Dla tych oznaczeń czułość, swoistość, i wartości predykcyjne wyników wynosiły blisko 80%, zarówno w grupie pacjentów z CD jak i z UC (Tab. 16 i 17). Przedstawiona charakterystyka diagnostyczna białek granulocytarnych wskazuje, że oznaczanie stężenia przede wszystkim elastazy leukocytarnej, jak również kalprotektyny i laktoferyny w osoczu może być pomocne w rozpoznawaniu IBD.

W niniejszej pracy dokonano również oceny związku stężenia badanych białek granulocytarnych z aktywnością CD (Tab. 18) i UC (Tab.20). U pacjentów z aktywną fazą (zaostrzeniem) CD stwierdzono większe stężenie laktoferyny i kalprotektyny niż u pacjentów w remisji (Tab. 18). Nie zaobserwowano natomiast znamienych różnic w średnich stężeniach elastazy. Analiza regresji logistycznej wykazała, że wzrost stężenia zarówno laktoferyny jak i kalprotektyny znamienne, aczkolwiek w niewielkim stopniu, zwiększa szansę wystąpienia zaostrzenia choroby (Tab. 19). W przypadku pacjentów z UC, stężenie żadnego z białek granulocytarnych nie różniło się znamienne u osób z aktywną fazą choroby w porównaniu z pacjentami w remisji (Tab 20). U pacjentów z zaostrzeniem UC stwierdzono znamienne

większą medianę liczby leukocytów i neutrofilii w porównaniu do chorych w remisji (Tab. 21). Uzyskane wyniki nie wskazują na przydatność oznaczeń białek granulocytarnych w osoczu dla celów oceny aktywności klinicznej IBD. Należy jednak zaznaczyć, że ocenę tego związku utrudniała mała liczba pacjentów w remisji zarówno CD jak i UC oraz zaostrzeniem CD w badanych grupach.

Udział elastazy leukocytarnej w patogenezie IBD oraz związek pomiędzy aktywnością kliniczną IBD a stężeniem elastazy oznaczanym zarówno w osoczu jak i w kale jest ostatnio sugerowany w piśmiennictwie (115; 136). Reakcja zapalna z udziałem neutrofilii prowadzi do uszkodzeń tkanek objętych zapaleniem. Z przedstawionych w tabelach 9 i 10 danych wynika, że duże stężenie kompleksu elastaza- α_1 AT u pacjentów z CD i z UC może odzwierciedlać wzrost aktywności neutrofilii, których liczba była u chorych z IBD także znamienne zwiększona (Tab. 6 i 7). Już wcześniej opisano wzrost stężenia elastazy leukocytarnej w surowicy u pacjentów z UC i wykazano, że stężenie tego białka (enzymu) koreluje z aktywnością choroby (115). Podobną do uzyskanej w niniejszej pracy charakterystykę diagnostyczną elastazy leukocytarnej przedstawili Kuno i wsp., którzy wykazali, że ten enzym ma wpływ na proliferację komórek i może zaburzać procesy naprawcze w błonie śluzowej jelit, a oznaczany w osoczu jest użytecznym niezależnym wskaźnikiem aktywności IBD, lepszym niż OB i CRP w identyfikowaniu pacjentów w remisji (137). Podobnie, w badaniu przeprowadzonym przez Gouni-Berthold i wsp. zaobserwowano większe stężenie elastazy leukocytarnej w osoczu w grupie 61 pacjentów z IBD (49 ng/ml) niż u 41 osób w grupie kontrolnej (23 ng/ml) (115). Stężenia elastazy w osoczu pacjentów z aktywną klinicznie chorobą były większe niż u pacjentów w remisji. Czulość diagnostyczna elastazy w wykrywaniu aktywnej choroby zapalnej jelit wynosiła około 60%, a swoistość 65%. Czulość diagnostyczna w wykrywaniu remisji wynosiła ponad 80%. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają korzystną charakterystykę diagnostyczną oznaczanej w osoczu elastazy leukocytarnej w rozpoznawaniu IBD, ale nie potwierdzają związku jej stężenia z aktywnością kliniczną zarówno CD jak i UC. Jak wspomniano wyżej, ograniczeniem tej ostatniej analizy była mała liczebność grup pacjentów.

Oznaczanie dwóch pozostałych ocenianych białek granulocytarnych, kalprotektyny i laktoferyny, było również przedmiotem licznych badań. Leach i wsp. opisali stężenie kalprotektyny w osoczu u 33 pacjentów z IBD (29 z CD, 4 z UC) oraz 6 z zespołem jelita drażliwego (IBS), 16 z celiakią oraz 33 osób zdrowych (138). Stwierdzili, że stężenie kalprotektyny w osoczu zarówno u pacjentów z UC jak i z CD było większe w porównaniu do

grupy kontrolnej. Wykazali także zwiększone stężenie kalprotektyny w homogenatach biopłatów ściany jelita pacjentów z UC, CD i celiakią. W tej pracy kalprotektyna charakteryzowała się dużą czułością i poprawną swoistością diagnostyczną (odpowiednio 91% i 71%) w rozpoznawaniu IBD (138). Podobną charakterystykę diagnostyczną kalprotektyny uzyskano w niniejszej pracy. Innym potwierdzeniem udziału neutrofilów w patogenezie IBD i możliwości diagnostycznego zastosowania kalprotektyny jest praca Foel i wsp., którzy badali wydzielanie kalprotektyny w jelitach u 60 pacjentów z IBD (30 z CD i 30 z UC), 30 z zespołem jelita drażliwego oraz 30 osób z grupy kontrolnej (139). Autorzy ci wykazali większe wydzielanie kalprotektyny w tkance objętej procesem zapalnym, ale nie stwierdzili różnic między wydzielaniem kalprotektyny w aktywnej i nieaktywnej CD.

Ostatnio prowadzone są badania nad wykorzystaniem oznaczeń wydalania kalprotektyny i laktoferyny w kale w różnicowaniu IBD z zespołem jelita drażliwego oraz w predykcji zaostrzenia IBD. Poszukiwanie nowych, swoistych wskaźników zapalenia jelit wydaje się niezbędne, ponieważ stosowane w rutynowej diagnostyce CRP i OB nie są markerami zapalenia swoistymi dla IBD i w części przypadków wyniki ich oznaczeń pozostają prawidłowe pomimo zapalenia jelit udokumentowanego endoskopowymi wskaźnikami aktywności choroby (132; 140). W 2008. wprowadzono do użytku jakościowe testy wykrywające kalprotektynę i laktoferynę w kale, używane w trybie POCT, w prognozowaniu zaostrzeń IBD. Te markery kałowe różnicują też IBD od zaburzeń czynnościowych, jak zespół jelita drażliwego. Oznaczania te mogą zmniejszyć liczbę inwazyjnych procedur diagnostycznych oraz badań radiologicznych. Ich wyniki korelują także z kliniczną oraz ocenianą endoskopowo aktywnością choroby u pacjentów z UC i, w mniejszym stopniu, z CD. W badaniu zawartości kalprotektyny, laktoferyny, CRP i leukocytów w kale u 136 osób (36 z CD, 28 z UC, 30 z IBS i 42 zdrowych) stwierdzono, że stężenie kalprotektyny i laktoferyny w kale było znacznie większe u pacjentów z IBD niż w grupie ludzi zdrowych i z IBS. Poziom CRP w kale był podwyższony tylko u pacjentów z IBD (141). Podobne wyniki dotyczące różnicowania aktywnej i nieaktywnej postaci zapalnych chorób jelit i zaburzeń czynnościowych uzyskali Langhorst i wsp. (3). Podsumowując, zarówno uzyskane w niniejszej pracy, jak i publikowane wyniki wskazują, że oznaczanie stężenia kalprotektyny i laktoferyny w osoczu i w kale może być przydatne w rozpoznawaniu IBD i różnicowaniu ich z zespołem jelita drażliwego oraz w ocenie stanu chorego (aktywności choroby), co może okazać się pomocne przy podejmowaniu decyzji o postępowaniu.

Jednym z celów przeprowadzonych badań była ocena liczby leukocytów i neutrofilii oraz wskaźników wyliczanych ze stężenia białek granulocytarnych i liczby tych krwinek we krwi w badanych grupach. Stwierdzono znamienne wzrost liczby leukocytów i neutrofilii u pacjentów z CD w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 6), przy porównywalnych współczynnikach białka granulocytarne/WBC i białka granulocytarne/NEU (Tab 9). Wyjątek stanowiły współczynniki laktoferyna/WBC oraz laktoferyna/NEU, które były znamienne większe niż u pacjentów z CD w porównaniu do grupy kontrolnej. Liczba leukocytów nie różnicowała grupy pacjentów z UC i grupy kontrolnej, u chorych na UC stwierdzono natomiast znamienne większą liczbę neutrofilii (Tab. 7). Ponadto, w grupie pacjentów z UC współczynniki elastaza, laktoferyna i kalprotektyna / WBC oraz elastaza i laktoferyna / NEU były znamienne większe niż w grupie kontrolnej, a współczynnik kalprotektyna/NEU był w obu tych grupach porównywalny (Tab. 10). Współczynniki elastaza i laktoferyna / NEU były u pacjentów z UC znamienne większe niż u pacjentów z CD (Tab. 11). Zwiększenie wymienionych współczynników u pacjentów z UC wskazuje na większą aktywność neutrofilii w patogenezie UC w porównaniu z CD. Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek migrujących z krwi do miejsca zapalenia. W ostatnich latach zmieniło się znacznie postrzeganie ich roli w procesie zapalnym. Pogląd, że neutrofile są jedynie komórkami biernie reagującymi na sygnały zewnętrzne uległ zmianie dzięki wykazaniu zdolności aktywowanych neutrofilii do pełnienia większości funkcji makrofagów (142). Stworzono hipotezę, że aktywowane neutrofile krążą we krwi pacjentów chorych na IBD. Zaobserwowano także, że tylko niewielka grupa pacjentów z IBD ma współistniejącą inną chorobę o podłożu zapalnym oraz że neutrofile ze spolaryzowaną błoną komórkową jest więcej u pacjentów z IBD niż u osób zdrowych. Polaryzacja błony jest tylko jednym z wielu procesów zachodzących jednocześnie podczas aktywacji neutrofilii (143). U pacjentów z CD i z UC (Tab. 12) stwierdzono korelacje pomiędzy stężeniem laktoferyny w osoczu a liczbą białych krwinek i neutrofilii. U pacjentów z UC podobne korelacje stwierdzono również dla kalprotektyny (Tab. 12). W grupie osób zdrowych te korelacje nie występowały (Tab. 12). Te dane również przemawiają za większą liczbą aktywowanych neutrofilii u pacjentów z UC. Wydaje się także, że stężenie laktoferyny najlepiej koreluje z aktywnością neutrofilii. Nie zaobserwowano natomiast różnic w medianach liczby neutrofilii oraz w medianach wyliczonych współczynników u pacjentów z aktywną klinicznie CD oraz UC i pacjentów w remisji (Tab. 18 i 20). Stwierdzono, że wszystkie parametry charakterystyki diagnostycznej miały tendencję malejącą w kolejności: stężenie białka granulocytarnego – współczynnik

białko/WBC – współczynnik białko/NEU (Ryc. 7 i 8). Ponadto, pole pod krzywą ROC dla liczby neutrofilii było niewielkie, a dokładność diagnostyczna rzędu 80%, zarówno w rozpoznawaniu CD (Tab. 16) jak i UC (Tab. 17). Ogółem, charakterystyka diagnostyczna liczby neutrofilii była gorsza niż stężenia elastazy, kalprotektyny czy laktoferyny, co przemawia za tym, że białka granulocytarne są lepszymi kandydatami na markery w diagnostyce IBD, niż liczba neutrofilii czy wyliczane w niniejszej pracy współczynniki. Należy zaznaczyć, że istotnym ograniczeniem oceny charakterystyki diagnostycznej opisanych badań była niewielka liczebność grup pacjentów (27 osób z CD, 33 osoby chore na UC).

W przebiegu uszkodzenia i martwicy komórek jelita zostają uwolnione z nich składniki cytoplazmy, między innymi I-FABP (121; 144). Produkowane tylko w enterocytach jelita cienkiego I-FABP może być potencjalnie przydatne w różnicowaniu CD i UC. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono jednak różnic między stężeniem I-FABP w grupie pacjentów z CD i w grupie kontrolnej (Tab. 9), w grupie pacjentów z UC (Tab. 10) i w grupie kontrolnej, ani pomiędzy grupą pacjentów z CD i z UC (Tab. 11). Nie stwierdzono także różnic w stężeniu I-FABP u pacjentów z zaostrzeniem i remisją CD, ani UC (Tab. 18 i 20). W świetle uzyskanych wyników I-FABP nie wydaje się być przydatne ani w diagnostyce IBD ani w ocenie aktywności klinicznej tych chorób. Publikowane doniesienia dotyczą głównie zmian stężenia I-FABP w chorobach jelita cienkiego, niewiele prac dotyczy roli I-FABP w diagnostyce IBD. Wykazano wzrost stężenia I-FABP w osoczu krwi chorych z mechaniczną niedrożnością jelita cienkiego i u noworodków z uszkodzeniem śluzówki jelita cienkiego w przebiegu martwiczego zapalenia jelit, a także u świnki morskiej w doświadczalnym niedokrwieniu jelit (145; 146; 147). Matsumoto i wsp. wykazali w badaniu 208 pacjentów z klinicznym podejrzeniem ostrego niedokrwienia jelit (24 pacjentów z niedokrwieniem pochodzenia naczyniowego, 62 pacjentów z niedokrwieniem pochodzenia nienaczyniowego oraz 122 bez choroby niedokrwiennej), że stężenie I-FABP w surowicy może być przydatnym biomarkerem w diagnostyce naczyniowego oraz nienaczyniowego niedokrwienia jelit (146). Odmiennie niż w niniejszej pracy, Wiercinska-Drapalo i wsp. wykonując badanie 42 pacjentów z UC oraz 50 zdrowych osób stwierdzili, że stężenie I-FABP jest znamienne większe w grupie z UC niż w grupie kontrolnej (166.9 ± 36.3 vs 61.3 ± 7.8 pg/ml, $p < 0,0001$) oraz jest znamienne większe u pacjentów z zaostrzeniem choroby w porównaniu do pacjentów w remisji (260.5 ± 60.6 vs 61.5 ± 7.9 pg/ml, $p < 0,0001$) (121).

Neopteryna jest wskaźnikiem aktywności układu immunologicznego. Wzrost stężenie neopteryny występuje w schorzeniach, w których pobudzona zostaje odporność typu komórkowego. Porównanie w niniejszej pracy median stężenia neopteryny w osoczu nie wykazało znamiennych różnic między pacjentami z CD, ani z UC a grupą kontrolną (Tab. 9 i 10), jak również między pacjentami z CD i z UC (Tab. 11). Nie stwierdzono także różnic w stężeniu neopteryny u pacjentów z aktywną klinicznie CD ani UC i remisją tych chorób (Tab. 18 i 19). Dane te przemawiają przeciwko wykorzystywaniu oznaczeń neopteryny w diagnostyce IBD. Nancey i wsp. wykazali, że stężenia neopteryny i kalprotektyny w kale korelują z endoskopowym indeksem aktywności UC (148). Wnioski wyciągnięte z badania Husain i wsp (149) potwierdziły zasadność oznaczania neopteryny w kale. Jej stężenie korelowało z aktywnością zarówno CD jak i UC. Jednak, podobnie jak w niniejszej pracy, autorzy nie zaobserwowali różnic w stężeniu neopteryny w surowicy chorych w remisji i z aktywną klinicznie CD czy UC (149). Podobnie Ciećko-Michalska i wsp. nie stwierdzili podwyższonego stężenia neopteryny w surowicy u pacjentów z CD ani z UC (123). Przeciwno przydatności oznaczeń stężenia I-FABP i neopteryny przemawia także stwierdzone w niniejszej pracy małe pole pod krzywą ROC dla obu badań (Ryc. 7 i 8) oraz ich niekorzystna charakterystyka w diagnostyce CD (Tab. 16) jak i UC (Tab. 17). Dla obu tych badań nie wykazano przewagi nad rutynowo stosowanymi oznaczeniami CRP.

Wśród poszukiwanych nieinwazyjnych, czułych i swoistych metod diagnostycznych służących do rozpoznawania i różnicowania IBD wyróżnia się dwa markery serologiczne: przeciwciała skierowane przeciwko cytoplazmie neutrofilii o świeceniu okołojądrowym (pANCA) oraz przeciwko drożdżom piekarskim (*Saccharomyces cerevisiae*, ASCA). W celu poszerzenia tego panelu badań ocenie poddaje się szereg kandydatów na markery wśród autoprzeciwciał oraz przeciwciał skierowanych głównie przeciw epitopom bakteryjnym.

W niniejszej pracy nie wykazano obecności badanych przeciwciał w grupie kontrolnej za wyjątkiem przeciwciał p-ANCA, które wykryto u 10% włączonych do badania osób zdrowych (Tab. 22). W grupie pacjentów z CD stwierdzono większą częstość występowania przeciwciał ASCA oraz CUZD1 (Tab. 22). Oceniono także panele przeciwciał charakterystyczne dla CD oraz dla UC. Wykazano, że występowanie panelu CUZD1 i/lub GP2, ASCA+ i pANCA- oraz ASCA+ i pANCA- i/lub CUZD1 i/lub GP2 jest znamienne częstsze u pacjentów z CD niż w grupie kontrolnej (Tab. 23). Zaobserwowano także, że częstość występowania wszystkich przeciwciała charakterystycznych dla CD łącznie jest największa. Znajduje to odzwierciedlenie w największej dokładności, czułości i swoistości

diagnostycznej oraz wartości predykcyjnej wyniku ujemnego dla tego panelu (Tab. 25). Dużą wartość predykcyjną wyniku dodatniego osiągnęły jedynie przeciwciała przeciw antygenom zewnątrzwydzielniczej części trzustki (CUZD1 i GP2), oznaczane pojedynczo lub w panelu.

Podobnie u pacjentów chorych na UC stwierdzono znamienne większą częstość występowania niż w grupie kontrolnej panelu ASCA- i ANCA+, GAB i/lub LFS oraz ASCA- i ANCA+ i/lub GAB i/lub LFS (Tab. 24). Podobnie jak w przypadku CD stwierdzono, że częstość występowania wszystkich przeciwciał charakterystycznych dla UC łącznie jest największa i panel ten charakteryzuje się największą dokładnością, czułością i swoistością diagnostyczną oraz wartością predykcyjną Wyniku ujemnego i dodatniego (Tab. 26). Uzyskane wyniki wskazują, że panele przeciwciał charakterystycznych dla CD i dla UC mogą być markerami serologicznymi pomocnymi w diagnostyce tych chorób.

Ocenie poddano także przydatność paneli przeciwciał w diagnostyce różnicowej CD i UC. Wykazano, że panel ANCA+ i ASCA- lepiej różnicował UC od CD niż pojedynczo oznaczane przeciwciała ANCA (Tab. 24). U pacjentów z CD częstość występowania ANCA wynosiła 7,4 %, natomiast panelu ANCA+ i ASCA – tylko 3,7%. Częstość występowania ANCA i panelu ANCA+ i ASCA- u pacjentów z UC była porównywalna. Oceniając panel poszerzony o przeciwciała przeciw komórkom kubkowym jelita oraz laktoferynie związanej z DNA (ANCA + i ASCA – i/lub GAB i/lub LFS) stwierdzono, że, pomimo wzrostu odsetka chorych na CD z dodatnim wynikiem (do 11,1%) w porównaniu z oznaczanymi pojedynczo ANCA oraz panelem ANCA+ i ASCA-, nastąpił wzrost odsetka chorych na UC z dodatnim wynikiem z 45,5 do 48,5% (Tab. 24). Stwierdzono także spadek odsetka chorych na CD z dodatnim wynikiem panelu przeciwciał ANCA- i ASCA+ w porównaniu do pojedynczo oznaczanych ASCA (Tab. 23). Jednak, oceniając panel poszerzony o przeciwciała przeciw glikoproteinom CUZD 1 i GP2 (ANCA - i ASCA + i/lub GP2 i/lub CUZD1) zaobserwowano wzrost ilości wyników dodatnich u pacjentów z CD (74%) (Tab. 23), ale także wzrost ilości wyników fałszywie dodatnich u osób z UC (12,1 %). Pomimo obserwowanego wzrostu liczby pacjentów, u których można na podstawie panelu potwierdzić rozpoznanie, zwiększenie liczby przeciwciał w panelu niesie ryzyko zwiększenia ilości wyników fałszywie dodatnich. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się udziałowi procesów autoimmunizacyjnych w patogenezie IBD i sugeruje się, że oznaczanie przeciwciał może być pomocne w diagnostyce różnicowej, szczególnie w panelach (połączeniu z innymi przeciwciałami rzadziej występującymi w IBD), co powoduje wzrost czułości i swoistości diagnostycznej badań. Ostatnie doniesienia sugerują, że przeciwciała mogą mieć znaczenie w przyszłości przy

wyborze optymalnej terapii w tzw. postaci granicznej IBD (*indeterminate colitis, IC*), występującej w około 5-15% przypadków i sprawiającej trudności diagnostyczne. W UC występują przeciwciała skierowane przeciwko komórkom kubkowym jelita (u 28% pacjentów) i przeciwko cytoplazmie granulocytów (pANCA, u 76% pacjentów). W CD 39% pacjentów wytwarza przeciwciała przeciwko komórkom zewnątrzwydzielniczym trzustki, a 67% pacjentów przeciwciała skierowane przeciwko drożdżom piekarskim (ASCA). Zgodnie z opublikowanymi danymi, oznaczając jednocześnie wszystkie cztery przeciwciała można potwierdzić serologicznie diagnozę u 83% pacjentów z UC i u 80% pacjentów z CD (150; 151; 152; 153). W niniejszym badaniu wykryto przeciwciała ANCA w mniejszym odsetku pacjentów z UC, co może być wynikiem małej liczebności grupy pacjentów chorych na UC, podobną częstość występowaniu stwierdzono natomiast dla przeciwciał ASCA.

Schaik i wsp. (45) prowadzili obserwację pacjentów z podejrzeniem IBD w badaniu EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study*). W sumie u 77 osób rozpoznano CD i u 167 UC po średnim okresie obserwacji wynoszącym odpowiednio $4,5 \pm 3,2$ i $4,4 \pm 3,1$ lat po pobraniu krwi. Stwierdzono, że najlepszym czynnikiem prognostycznym dla IBD był panel przeciwciał pANCA, ASCA, anty-CBir1 i anty-OmpC – pole pod krzywą ROC odpowiednio 0,679 i 0,657. Kovacs i wsp. (154) zaobserwowali, że obecność przeciwciał przeciw zewnątrzwydzielniczej części trzustki (PAB) była znamienne częstsza w CD (34%) i w UC (20,4%) w porównaniu z pediatryczną grupą kontrolną (0% p < 0,0001 dla obu chorób). Ponadto stwierdzono, że przeciwciała przeciwko komórkom kubkowym (GAB) występują znamienne częściej u pacjentów z UC w porównaniu z CD i grupą kontrolną (odpowiednio: 12,2%, 1,9%, 1,9%; p = 0,02). swoistość diagnostyczna PAB wynosiła 100%, jednak czułość była niska. Dla panelu PAB i/lub ASCA oraz ANCA czułość diagnostyczna była większa i wynosiła w CD 87,4% i w UC 79,6%, a swoistość odpowiednio 89,3% i 93,2%. Autoprzeciwciała przeciwko antygenom trzustki (PAB) i GAB nie były związane ze stanem klinicznym, leczeniem zachowawczym ani koniecznością zabiegu w CD ani w UC (154).

Podsumowując, na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy i opublikowanych przez innych autorów można wyciągnąć wniosek, że tylko opisane panele przeciwciał mogą być przydatne zarówno w diagnostyce IBD jak i różnicowaniu UC od CD.

Pomimo prób wdrażania nowych badań laboratoryjnych, w tym tzw. markerów kałowych, od niedawna wprowadzanych do praktyki klinicznej, diagnostyka IBD ciągle ma ograniczenia. Rutynowo stosowane badania laboratoryjne, głównie mało swoiste wskaźniki

procesu zapalnego nie mają charakterystyki diagnostycznej wystarczającej dla rozpoznawania i różnicowania IBD. W poszukiwaniu nowych, bardziej swoistych markerów tych chorób, większość badań koncentruje się na oznaczaniu białek granulocytarnych w kale. Dokonana w niniejszej pracy ocena przydatności oznaczania tych białek w osoczu wpisuje się w koncepcję diagnostyki IBD opartą na istotnej roli neutrofilii w patogenezie tych chorób. Uzyskane wyniki są tej roli potwierdzeniem, a charakterystyka diagnostyczna oznaczeń elastazy leukocytarnej, kalprotektyny i laktoferyny w osoczu wskazuje na ich potencjalną przydatność w praktyce klinicznej. Zjawiska autoimmunizacyjne, również odgrywające istotną rolę w patogenezie IBD, wyznaczają drugi kierunek diagnostyki laboratoryjnej tych chorób – oznaczanie przeciwciał i autoprzeciwciał, także poddane ocenie w niniejszej pracy. Stwierdzono, że oceniane przeciwciała, choć cechują się zróżnicowaną częstością występowania u osób zdrowych oraz chorych na IBD, mogą być użyteczne diagnostycznie jedynie w panelach charakterystycznych dla CD i UC. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki łącznie z publikowanymi danymi wskazują, że istnieją możliwości poszerzenia diagnostyki IBD o nowe badania laboratoryjne oraz poprawy jakości rozpoznawania i różnicowania tych chorób.

6. WNIOSKI

1. Stężenia elastazy leukocytarnej, kalprotektyny oraz laktoferyny w osoczu są znamienne większe u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu ze stężeniami w grupie kontrolnej.
2. Charakterystyka diagnostyczna liczby neutrofilii oraz stężenia elastazy leukocytarnej, kalprotektyny i laktoferyny w osoczu wskazuje na przydatność tych badań w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit.
3. Znamienne większe współczynniki elastaza/NEU i laktoferyna/NEU u pacjentów chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego w porównaniu z pacjentami z chorobą Leśniowskiego-Crohna mogą być przydatne w różnicowaniu tych chorób.
4. Stężenie kalprotektyny i laktoferyny w osoczu jest większe u pacjentów z aktywną fazą choroby Leśniowskiego-Crohna niż u pacjentów w remisji, co wskazuje na przydatność tych badań w ocenie aktywności choroby.
5. Nie wykazano znamiennego wzrostu stężenia I-FABP ani neopteryny w osoczu pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit.
6. Panel przeciwciał ASCA, ANCA oraz panel przeciwciał ASCA, ANCA, GAB, LFS, CUZD1 i GP2 może być stosowany w różnicowaniu choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

7. STRESZCZENIE

Nieswoiste zapalenia jelit są grupą przewlekłych schorzeń zapalnych zajmujących przewód pokarmowy. Wyróżnia się wśród nich wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna. W około 15% przypadków trudno jest postawić diagnozę w oparciu o kryteria kliniczne, radiologiczne oraz histopatologiczne. W przeprowadzonym badaniu oceniono użyteczność trzech białek granulocytarnych (elastazy leukocytarnej, laktoferyny, kalprotektyny), jelitowego białka wiążącego wolne kwasy tłuszczowe (I-FABP) oraz neopteryny jako potencjalnych biomarkerów w diagnostyce oraz ocenie aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Dodatkowo oceniono występowanie wybranych przeciwciał w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit. Do badania zakwalifikowano 27 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 33 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz 20 osób zdrowych w grupie kontrolnej. Stężenia wybranych wskaźników oraz występowanie przeciwciał porównano w badanych grupach. Stężenie kalprotektyny, laktoferyny, elastazy, I-FABP i neopteryny w osoczu oznaczano przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA. Przeciwciała ANCA, ASCA, LFS, GAB, CUZD1 i GP2 były wykrywane w surowicy przy użyciu immunofluorescencji pośredniej. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz na wrzodziejące zapalenie jelita grubego stwierdzono znamienne większe stężenie elastazy, kalprotektyny oraz laktoferyny w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej. Charakterystyka diagnostyczna tych oznaczeń wskazuje na ich użyteczność w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit. Zaobserwowano też znamienne większy współczynnik elastaza/NEU oraz laktoferyna/NEU u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wskaźniki te mogą być przydatne w diagnostyce różnicowej tych chorób. Nie stwierdzono różnic w stężeniu I-FABP ani neopteryny u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. Stężenie kalprotektyny oraz laktoferyny w osoczu było większe u pacjentów z zaostrzeniem choroby Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z pacjentami w remisji, co może wskazywać na użyteczność tych testów w ocenie aktywności choroby. Panel przeciwciał ASCA, ANCA, oraz panel ASCA, ANCA, GAB, LFS, CUZD1 i GP2 może być użyteczny w diagnostyce różnicowej choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

8. SUMMARY

Inflammatory bowel diseases are chronic diseases of gastrointestinal tract, which include Crohn's disease and ulcerative colitis. About 15% of cases are difficult to diagnose using clinical, radiological and histopathological methods. In this study three neutrophilic proteins (leukocyte elastase, lactoferrin, calprotectin), intestinal fatty acid binding protein and neopterin were evaluated as biomarkers used in the diagnosis and the assessment of clinical activity of Crohn's disease and ulcerative colitis. Additionally a set of antibodies was evaluated. The study included 27 patients with Crohn's disease, 33 patients with ulcerative colitis and 20 healthy controls. Plasma concentrations of the studied proteins and the presence of antibodies were compared between the studied groups. Plasma calprotectin, lactoferrin, elastase, I-FABP and neopterin concentrations were measured using ELISA. ANCA, ASCA, LFS, GAB, CUZD1 and GP2 antibodies were detected using indirect immunofluorescence. In patients with both inflammatory bowel diseases higher plasma concentrations of leukocyte elastase, calprotectin and lactoferrin than in control group were found. Diagnostic characteristics of these tests indicate their usefulness in the IBD diagnosis. Significantly higher elastase/NEU and lactoferrin/NEU ratios in patients with ulcerative colitis as compared to patients with Crohn's disease can be useful in the differential diagnosis of these diseases. There was no significant increase neither in I-FABP, nor in neopterin levels in patients with IBD. Plasma calprotectin and lactoferrin levels were higher in patients with the active phase of Crohn's disease as compared to patients in remission, indicating the usefulness of these tests in the assessment of disease activity. The panels of antibodies ASCA & ANCA, and ASCA, ANCA, GAB, LFS, CUZD1 & GP2 may be useful for the differentiation of Crohn's disease and ulcerative colitis.

9. SPIS RYCIN

RYCINA 1. ZAPADALNOŚĆ NA CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO NA ŚWIECIE [WG NG I WPS (6)]	12
RYCINA 2. ZAPADALNOŚĆ NA CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO W EUROPIE [WG FRANGOS I WSP. (19)]	13
RYCINA 3. PRAWIDŁOWO DZIAŁAJĄCY JELITOWY UKŁAD ODPORNOŚCIOWY [BAUMGART I WSP (53)].....	21
RYCINA 4 DYSFUNKCJA JELITOWEGO UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W NIESWOISTYCH ZAPALENIACH JELIT [BAUMGART I WSP (53)]	22
RYCINA 5. CHARAKTERYSTYKA PACJENTÓW Z CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA (PRZEBYTE POWIKŁANIA, WSPÓLISTNIEJĄCE CHOROBY, PRZEBYTE OPERACJE).....	34
RYCINA 6. CHARAKTERYSTYKA PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO (PRZEBYTE POWIKŁANIA, WSPÓLISTNIEJĄCE CHOROBY, PRZEBYTE OPERACJE) ..	34
RYCINA 7. KRZYWE ROC DLA LICZBY LEUKOCYTÓW I NEUTROFILI, STĘŻENIA BIAŁEK GRANULOCYTARNYCH, CRP, I-FABP I NEOPTERYNY ORAZ WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW W GRUPIE PACJENTÓW Z CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I W GRUPIE KONTROLNEJ (AUC-POLE POD KRZYWĄ).....	51
RYCINA 8. KRZYWE ROC DLA LICZBY LEUKOCYTÓW I NEUTROFILI, STĘŻENIA BIAŁEK GRANULOCYTARNYCH, CRP, I-FABP I NEOPTERYNY ORAZ WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW W GRUPIE PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO I W GRUPIE KONTROLNEJ (AUC-POLE POD KRZYWĄ)	52

10. SPIS TABEL

TABELA 1. CHARAKTERYSTYKA GRUP BADANYCH.....	33
TABELA 2. OBLICZANIE WSKAŹNIKA AKTYWNOŚCI CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA (CDAI) WG BESTA I WSP (124).....	35
TABELA 3. KLASYFIKACJA WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIA JELITA GRUBEGO NA PODSTAWIE CECH KLINICZNYCH WG TRUELOVE-WITTTSA (125).....	36
TABELA 4. OCENA MIKROSKOPOWA REAKCJI NA SZKIELKU BIOCHIP SŁUŻĄCYM DO BADANIA PRZECIWCIAŁ PANELU JELITOWEGO CIBD	40
TABELA 5. WZORY NA PARAMETRY CHARAKTERYSTYKI DIAGNOSTYCZNEJ TESTU	42
TABELA 6. PORÓWNANIE WYNIKÓW MORFOLOGII KRWI U PACJENTÓW Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I W GRUPIE KONTROLNEJ	44
TABELA 7. PORÓWNANIE WYNIKÓW MORFOLOGII KRWI U PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO I W GRUPIE KONTROLNEJ	44
TABELA 8. PORÓWNANIE WYNIKÓW MORFOLOGII KRWI U PACJENTÓW CHORYCH CHOROBE LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I U PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO.....	45
TABELA 9. PORÓWNANIE WYNIKÓW OZNACZEŃ BIAŁEK GRANULOCYTARNYCH, WSKAŹNIKÓW ZAPALNYCH I I-FABP W GRUPIE PACJENTÓW Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I W GRUPIE KONTROLNEJ	46
TABELA 10. PORÓWNANIE WYNIKÓW OZNACZEŃ BIAŁEK GRANULOCYTARNYCH, WSKAŹNIKÓW ZAPALNYCH I I-FABP W GRUPIE PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO I W GRUPIE KONTROLNEJ	47
TABELA 11. PORÓWNANIE WYNIKÓW OZNACZEŃ BIAŁEK GRANULOCYTARNYCH, WSKAŹNIKÓW ZAPALNYCH I I-FABP W GRUPIE PACJENTÓW Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I PACJENTÓW CHORYCH NA WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO.....	47
TABELA 12. OCENA ZWIĄZKU POMIĘDZY WYNIKAMI BADAŃ BIOCHEMICZNYCH A LOG LICZBY LEUKOCYTÓW I NEUTROFILI (KORELACJA PEARSONA)	48
TABELA 13. WSPÓLZALEŻNOŚĆ MIĘDZY WYNIKAMI BADAŃ W GRUPIE KONTROLNEJ (KORELACJA PEARSONA)	49
TABELA 14. WSPÓLZALEŻNOŚĆ MIĘDZY WYNIKAMI BADAŃ W GRUPIE Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA (KORELACJA PEARSONA)	49

TABELA 15. WSPÓLZALEŻNOŚĆ MIĘDZY WYNIKAMI BADAŃ W GRUPIE Z WRZODZIEJĄCYM ZAPALENIEM JELITA GRUBEGO (KORELACJA PEARSONA).....	49
TABELA 16. CHARAKTERYSTYKA DIAGNOSTYCZNA OCENIANYCH BADAŃ W ROZPOZNAWANIU CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA	53
TABELA 17. CHARAKTERYSTYKA DIAGNOSTYCZNA OCENIANYCH BADAŃ W ROZPOZNAWANIU WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIA JELITA GRUBEGO	53
TABELA 18. PORÓWNANIE WYNIKÓW OCENIANYCH BADAŃ I WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW U PACJENTÓW Z ZAOSTRZENIEM I REMISJĄ CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA NA PODSTAWIE CDAI.....	54
TABELA 19. OCENA ZWIĄZKU WYNIKÓW BADAŃ I WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW Z AKTYWNOŚCIĄ KLINICZNĄ CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA PRZY POMOCY REGRESJI LOGISTYCZNEJ.....	55
TABELA 20 PORÓWNANIE WYNIKÓW OCENIANYCH BADAŃ I WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW U PACJENTÓW Z ZAOSTRZENIEM I REMISJĄ WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIE JELITA GRUBEGO WG KRYTERIA TRUELOVE-WITTSA.....	56
TABELA 21 . OCENA ZWIĄZKU WYNIKÓW BADAŃ I WYLICZONYCH WSKAŹNIKÓW Z AKTYWNOŚCIĄ KLINICZNĄ WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIE JELITA GRUBEGO PRZY POMOCY REGRESJI LOGISTYCZNEJ.....	56
TABELA 22. PORÓWNANIE CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA PRZECIWCIAŁ MIĘDZY BADANYMI GRUPAMI	57
TABELA 23. PORÓWNANIE WYSTĘPOWANIA PANELI PRZECIWCIAŁ SPECYFICZNYCH DLA CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA W GRUPIE PACJENTÓW Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I WRZODZIEJĄCYM ZAPALENIEM JELITA GRUBEGO.....	58
TABELA 24. PORÓWNANIE WYSTĘPOWANIA PANELI PRZECIWCIAŁ CHARAKTERYSTYCZNYCH DLA WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIE JELITA GRUBEGO U PACJENTÓW Z CHOROBA LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I WRZODZIEJĄCYM ZAPALENIEM JELITA GRUBEGO	58

11. Piśmiennictwo

1. **Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L.** Interna Harrisona tom III. Lublin 2002 : Wyd. Czelej, 2002, strony 2825-2843.
2. **Rydzewska, G.** Informacja na temat funkcjonowania strony internetowej poświęconej chorobie Leśniowskiego-Crohna. *Przegl Gastroenterolog.* 2006, Tom 2, 92-95.
3. **Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ.** Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol.* 2008, Tom 103, 162-169.
4. **Bartnik, W.** Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Gastroenterol Polska 2007.* 2007, Tom 1, 3-13.
5. **Miheller P, Kiss LS, Juhasz M, Mandel M, Lakatos PL.** Recommendations for identifying Crohn's disease patients with poor prognosis. *Expert Rev Clin Immunol.* 9, 2013, Tom 1, 65-75.
6. **Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV Jr, Tysk C, O'Morain C, Moum B, Colombel JF.** Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut.* 62, 2013, Tom 4, 630-649.
7. **Abramson O, Durant M, Mow W, Finley A, Kodali P, Wong A, Tavares V, McCroskey E, Liu L, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Velayos FS, Perry GS, Cannon R, Herrinton LJ.** Incidence, prevalence, and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *J Pediatr.* 157, 2010, Tom 2, 233-239.
8. **Thia KT, Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Yang SK.** An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol.* 103, 2008, Tom 12, 3167-3182.
9. **Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG.** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 142, 2012, Tom 1, 46-54.
10. **Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM.** Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis.* 2011, Tom 1, 423-439.

11. **Martín-de-Carpi J, Rodríguez A, Ramos E, Jiménez S, Martínez-Gómez MJ, Medina E.** Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): the SPIRIT Registry. *Inflamm Bowel Dis.* 19, 2013, Tom 1, 73-80.
12. **Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Dupas JL, Merle V, Laberrenne JE, Salomez JL, Lerebours E, Turck D, Cortot A, Gower-Rousseau C, Colombel JF.** The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Aliment Pharmacol Ther.* . 33, 2011, Tom 10, 1133-1142.
13. **Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A.** Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 140, 2011, Tom 6, 1785-1794.
14. **Gearry RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML.** Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 25, 2010, Tom 2, 325-333.
15. **Wilson J, Hair C, Knight R, Catto-Smith A, Bell S, Kamm M, Desmond P, McNeil J, Connell W.** Inflamm Bowel Dis. *High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: a prospective population-based Australian incidence study.* 16, 2010, Tom 9, 1550-1556.
16. **Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M.** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut.* 39, 1996, Tom 5, 690-697.
17. **Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A.** The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 20, 2008, Tom 9, 917-923.
18. **Frangos CC, Frangos CC.** Inflammatory bowel disease: reviewing an old study under a new perspective. *Gut.* 56, 2007, Tom 11, 1638.
19. **Lakatos, PL.** Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol.* 12, 2006, Tom 38, 6102-6108.
20. **Moum B, Vatn MH, Ekbohm A, Aadland E, Fausa O, Lygren I, Sauar J, Schulz T, Stray N.** Incidence of Ulcerative Colitis and Indeterminate Colitis in Four Counties of Southeastern Norway, 1990–93 A Prospective Population-Based Study. *Scand J Gastroenterol.* 31, 1996, 362–366.

21. **Lehtinen P, Ashorn M, Iltanen S, Jauhola R.** Incidence Trends of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in. *Inflamm Bowel Dis.* 17, 2011, 1778-1783.
22. **Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P.** Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol.* 11, 2005, Tom 10, 1489-1495.
23. **Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Lakatos PL.** Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis.* 17, 2011, Tom 12, 2558-2565.
24. **Sincić BM, Vucelić B, Persić M, Brncić N, Erzen DJ, Radaković B, Mićović V, Stimac D.** Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol.* 41, 2006, Tom 4, 437-444.
25. **Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D.** Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in. *World J Gastroenterol.* 11, 2005, 2630-2633.
26. **Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S.** Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 81, 2006, Tom 11, 1462-1471.
27. **Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekbohm A, Eklund A, Höglund CO, Askling J.** Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 181, 2010, Tom 11, 1217-1222.
28. **Holm H, Jarvis MJ, Russell MA, Feyerabend C.** Nicotine intake and dependence in Swedish snuff takers. *Psychopharmacology.* 108, 1992, Tom 4, 507-511.
29. **Reif S, Klein I, Arber N, Gilat T.** Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology.* 108, 1995, Tom 6, 1683-1687.
30. **Reif S, Lavy A, Keter D, Fich A, Eliakim R, Halak A, Broide E, Niv Y, Ron Y, Patz J, Odes S, Villa Y, Gilat T.** Lack of association between smoking and Crohn's disease but the usual association with ulcerative colitis in Jewish patients in Israel: a multicenter study. *Am J Gastroenterol.* 95, 2000, Tom 2, 474-478.

31. **Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP.** Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 110, 1996, Tom 2, 424-431.
32. **Ali S, Tamboli CP.** Advances in epidemiology and diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Curr Gastroenterol Rep*. 10, 2008, Tom 6, 576-584.
33. **Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A.** Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 344, 2001, Tom 11, 808-814.
34. **López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernández-Rodríguez CM.** Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol*. 45, 2010, Tom 12, 1464-1471.
35. **Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA.** Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*. 8, 2002, Tom 4, 277-286.
36. **Roblin X, Neut C, Darfeuille-Michaud A, Colombel JF.** Local appendiceal dysbiosis: the missing link between the appendix and ulcerative colitis? *Gut*. 61, 2012, Tom 4, 635-636.
37. **Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjønneland A, Vogel U.** Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 44, 2012, Tom 3, 185-194.
38. **Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E.** Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis*. 5, 2011, Tom 4, 279-286.
39. **Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, Higuchi L, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT.** Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut*. 61, 2012, Tom 12, 1689-1692.
40. **Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM, Bao Y, Korzenik JR, Giovannucci EL, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT.** Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 142, 2012, Tom 3, 482-489.
41. **Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP.** The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 103, 2008, Tom 9, 2394-2400.
42. **Bucher A., Iwańczak F.** Etiopatogeneza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Nowa Pedriatria*. 2002, Tom 3, 174-178.
43. **Radwan P., Radwan-Kwiatk K., Skrzydło-Radomańska B.** Rola mikroflory jelitowej w nieswoistych zapaleniach jelit. *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2009, Tom 1, 1-6.

44. **Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, Molnar K, Szabo D, Cseh A, Dezsöfi A, Arato A, Veres G.** Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 55, 2012, Tom 4, 429-435.
45. **van Schaik FD, Oldenburg B, Hart AR, Siersema PD, Lindgren S, Grip O, Teucher B, Kaaks R, Bergmann MM, Boeing H, Carbonnel F, Jantchou P, Boutron-Ruault MC, Tjønneland A, Olsen A, Crowe FL, Peeters PH, van Oijen MG, Bueno-de-Mesquita HB.** Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut.* 62, 2013, Tom 5, 683-688.
46. **Cario, E.** Toll-like Receptors in Inflammatory bowel disease. A decade Later. *Inflamm Bowel Dis.* 16, 2010, Tom 9, 1583-1597.
47. **Maloy KJ, Powrie F.** Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 474, 2011, Tom 7351, 298-306.
48. **Shanahan, F.** Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology.* 120, 2001, Tom 3, 622-635.
49. **Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W.** Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis.* 12, 2006, Tom 11, 1068-1083.
50. **Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, Geary R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malfertheiner, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G.** World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis.* 16, 2010, Tom 1, 112-124.
51. **Guariso G, Gasparetto M, Visonà Dalla Pozza L, D'Inca R, Zancan L, Sturniolo G, Brotto F, Facchin P.** Inflammatory bowel disease developing in paediatric and adult age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 51, 2010, Tom 6, 698-707.
52. **Ruemmele, FM.** Pediatric inflammatory bowel diseases: coming of age. *Curr Opin Gastroenterol.* 26, 2010, Tom 4, 332-336.
53. **Baumgart DC, Sandborn WJ.** Crohn's disease. *Lancet.* 380, 2012, 1590-1605.
54. **Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S.** Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis.* 14, 2008, 968-976.

55. **Bengtson MB, Solberg C, Aamodt G, et al, and the Ibsen Study Group.** Clustering in time of familial IBD separates ulcerative colitis from Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1867–74. 15, 2009, 1867-1874.
56. **Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW iwsp.** Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 42, 2010, Tom 12, 1118-1125.
57. **Szeliga J., Sońdka Z., Jackowski M., Jarkiewicz-Trertn J., Tretyn A.** Zarys immunopatogenezy choroby Leśniowskiego – Crohna ze szczególnym uwzględnieniem roli polimorfizmu genu NOD2/CARD15. *Gastroenterol Polska.* 2, 2007, 129-133.
58. **Wierzbicki M., Brzezińska- Błaszczyk E.** Rola komórek tucznych w rozwoju przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit. *Postępy Hig Med. Dośw.* 62, 2008, 642-650.
59. **Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S.** Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 60, 2011, 631-637.
60. **Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, Tagesson C, Sjö Dahl R.** Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut.* 50, 2002, Tom 3, 307-313.
61. **Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD.** Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 56, 2007, Tom 1, 61-72.
62. **Weber CR, Raleigh DR, Su L, Shen L, Sullivan EA, Wang Y, Turner JR.** Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem.* 2010 Apr 16;285(16):12037-46. 285, 2010, Tom 16, 12037-12046.
63. **Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR 2nd, Raleigh DR, Guan Y, Watson AJ, Montrose MH, Turner JR.** Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol.* 189, 2010, Tom 1, 111-126.
64. **Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, Meddings JB, Van Eldik LJ, Watterson DM, Clarke LL, Mrsny RJ, Turner JR.** Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier

dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest.* 115, 2005, Tom 10, 2702-2715.

65. **Barreau F, Madre C, Meinzer U, Berrebi D, Dussailant M, Merlin F, Eckmann L, Karin M, Sterkers G, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Hugot JP.** Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut.* 59, 2010, Tom 2, 207-217.

66. **Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H.** Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut.* 55, 2006, Tom 3, 342-347.

67. **Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E, Tegatz P, Barman M, Hayward M, Eastwood D, Stoel M, Zhou Y, Sodergren E, Weinstock GM, Bevins CL, Williams CB, Bos NA.** Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* 11, 2010, Tom 1, 76-83.

68. **Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW 4th.** A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 456, 2008, Tom 7219, 256-263.

69. **Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis EE, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS.** XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 134, 2008, Tom 5, 743-756.

70. **Biswas A, Liu YJ, Hao L, Mizoguchi A, Salzman NH, Bevins CL, Kobayashi KS.** Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 2010, Tom 33, 14739-14744.

71. **Heijmans J, van Lidth de Jeude JF, Koo BK, Rosekrans SL, Wielenga MC, van de Wetering M, Ferrante M, Lee AS, Onderwater JJ, Paton JC, Paton AW, Mommaas AM, Kodach LL, Hardwick JC, Hommes DW, Clevers H, Muncan V, van den Brink GR.** ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response. *Cell Rep.* 3, 2013, Tom 4, 1128-1139.

72. **Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC.** CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 307, 2005, Tom 5707, 254,258.

73. **Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, Pascher A, Grötzinger C, Przesdzin I, Dörffel Y, Schmitz J, Thomas S.** Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 166, 2011, Tom 1, 46-54.
74. **Baumgart DC, Thomas S, Przesdzin I, Metzke D, Bielecki C, Lehmann SM, Lehnardt S, Dörffel Y, Sturm A, Scheffold A, Schmitz J, Radbruch A.** Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 157, 2009, Tom 5, 423-436.
75. **Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, Dignass AU.** Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut.* 54, 2005, Tom 2, 228-236.
76. **Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ.** Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 129, 2005, Tom 1, 50-65.
77. **Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R.** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 118, 2004, Tom 2, 229-241.
78. **Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, Foschi D, Caprioli F, Viale G, Rescigno M.** Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut.* 2009. 58, 2009, Tom 11, 1481-1489.
79. **van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ.** Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet.* 365, 2005, Tom 9473, 1794-1796.
80. **Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A.** NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* 16, 2010, Tom 1, 90-97.
81. **Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ.** Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* 2010. 11, 2010, Tom 1, 55-62.
82. **Weaver CT, Hatton RD.** Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol.* 9, 2009, Tom 12, 883-889.

83. **Bouma G, Strober W.** The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 3, 2003, Tom 7, 521-533.
84. **Elson, CO.** Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterol.* 119, 2000, Tom 1, 254-257.
85. **Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, i wsp.** Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 36, 2009, Tom 21, 2033-2045.
86. **Grzybowska, K.** Udział układu immunologicznego w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u dzieci,. *Nowa Pediatria.* 1, 2003, 81-84.
87. **Neuman, MG.** Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res.* 2007 Apr;149(4):173-86. 149, 2007, Tom 4, 173-186.
88. **Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A.** Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroentero.* 99, 2004, Tom 11, 2235-2241.
89. **Nisihara RM, de Carvalho WB, Utiyama SR, Amarante H, Baptista ML.** Diagnostic role and clinical association of ASCA and ANCA in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* . 55, 2010, Tom 8, 2309-2315.
90. **Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A.** Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012, Tom 30, 459-489.
91. **Cross AR, Segal AW.** The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 2004, Tom 1657, 1-22.
92. **Papayannopoulos V, Zychlinsky A.** NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009, Tom 30, 513-521.
93. **Faurschou M, Borregaard N.** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* . 2003, Tom 5, 1317-1327.
94. **Kühl AA, Kakirman H, Janotta M, Dreher S, Cremer P, Pawlowski NN, Loddenkemper C, Heimesaat MM, Grollich K, Zeitz M, Farkas S, Hoffmann JC.** Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterol.* 2007, Tom 133, 1882-1892.

95. **Zhang R, Ito S, Nishio N, Cheng Z, Suzuki H, Isobe K.** Up-regulation of Gr1+CD11b+ population in spleen of dextran sulfate sodium administered mice works to repair colitis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. . 2011, Tom 19, 39-46.
96. **Natsui M, Kawasaki K, Takizawa H, Hayashi SI, Matsuda Y, Sugimura K, Seki K, Narisawa R, Sendo F, Asakura H.** Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997, Tom 12, 801-808.
97. **Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, Lähde M, Korpela R, Vapaatalo H, Moilanen E.** Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, Tom 298, 1128-1132.
98. **Fournier BM, Parkos CA.** The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012, Tom 5, 354-366.
99. **Soehnlein O, Lindbom L.** Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010, Tom 10, 427-439.
100. **Hayee B, Rahman FZ, Tempero J, McCartney S, Bloom SL, Segal AW, Smith AM.** The neutrophil respiratory burst and bacterial digestion in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. . 2011, Tom 56, 1482-1488.
101. **Curran FT, Allan RN, Keighley MR.** Superoxide production by Crohn's disease neutrophils. *Gut*. . 1991, Tom 32, 399-4022.
102. **Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, Lees W, Novelli M, Bloom S, Segal AW.** Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006, Tom 367, 668-678.
103. **Lampinen M, Sangfelt P, Taha Y, Carlson M.** Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. *Int J Colorectal Dis*. . 2008, Tom 23, 939-946.
104. **Mokrowiecka A, Malecka-Panas E.** Różnicowanie i leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Przew Lek*. 2007, Tom 1, 56-65.
105. **Gajewski P, Szczeklik A.** Interna Szczeklika - Podręcznik chorób wewnętrznych 2013. 5, 2013, Tom I, strony 811-826.
106. **Hotari R., Miura S.** Neutrophil elastase in colitis. *J of Gastroenterol* . 2006, Tom 41, 395-396.

107. **Vermeire S., Van Assche G., Rutgeerts P.** C-reactive protein as a Marker for Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Bowel Disease*. 2004, Tom 5, 661-665.
108. **All-Haddad S., Riddell R.H.** The role of eosinophils in inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2005, Tom 54, 1674-1675.
109. **Nieswold T. Meinen M., van der Meulen J.** Plasma intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) concentrations increase following intestinal ischemia in pigs. *Res Vet Sci*. 2004, Tom 1, 89-91.
110. **Dallegri F., Ottonello L.** Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Res*. 1997, Tom 46, 382-391.
111. **Weiss, SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989, Tom 320, 365-379.
112. **Morohoshi Y1, Matsuoka K, Chinen H, Kamada N, Sato T, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T.** Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol*. 41, 2006, Tom 4, 318-324.
113. **Kohri K, Ueki IF, Nadel JA.** Neutrophil elastase induce mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002, Tom 283, L531-540.
114. **Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S.** Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol*. 2003, Tom 170, 5690-5696.
115. **Gouni-Berthold I, Baumeister B, Wegel E, Berthold HK, Vetter H, Schmidt C.** Neutrophil-elastase in chronic inflammatory bowel disease: a marker of disease activity? *Hepatogastroenterology*. 1999, Tom 46, 2315-2320.
116. **Burns S., Bisset W., Golden B.** Faecal calprotectin: an objective measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J of Paediat Gastroenterol* 2001, 32, 171-177. 2001, Tom 32, 171-177.
117. **Fagerberg UL1, Lööf L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y.** Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal syndromes. *J of Pediat Gastroenterol Nutr* . 2005, Tom 40, 450-455.
118. **Vermeire S., Van Assche G., Rutgeerts P.** Laboratory markers in IBD: useful, magic or unnecessary toys? *Gut*. 2006, Tom 55, 426-443.

119. **Borkowska A., Liberek A., Plata-Nazar K., Kamińska B.** Przydatność diagnostyczna oznaczania w stolcu parametrów stanu zapalnego u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Med. wieku rozwoj.* 2010, Tom XIV, 37-41.
120. **Walker TR, Land ML, Kartashov A, Saslowsky TM, Lysterly DM, Boone JH, Rufo PA.** Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker of disease activity in children and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, Tom 44, 414-422.
121. **Wiercinska-Drapalo A., Jaroszewicz J., Siwak E., Pogorzelska J, Prokopowicz D.** Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regulatory Peptides* . 2008, Tom 147, 25-28.
122. **Wietlicka I, Korzeniowska K, Jabłeczka A.** Neopteryna. *Farmacja Wspól.* 2008, Tom 1, 241-247.
123. **Ciećko-Michalska I, Fedak D, Mach T.** Neopterin in assessing the activity of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis and Crohn's disease. *Przegl Lek.* . 2010, Tom 67, 1262-1265.
124. **Gordon LK, Eggena M, Targan SR, Braun J.** Mast cell and neuroendocrine cytoplasmic autoantigen(s) detected by monoclonal pANCA antibodies. *Clin Immunol.* 2000 *Jan;94(1):42-50.* 94, 2000, Tom 1, 42-50.
125. **Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P.** Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 93, 2001, Tom 3, 730-734.
126. **Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, Picornell Y, Landers CJ, Fariior S, Wrobel I, Quiros A, Vasiliauskas EA, Grill B, Israel D, Bahar R, Christie D, Wahbeh G, Silber G, Dallazadeh S, Shah P, Thomas D, Kelts D, Hershberg RM, Elson CO, Targan SR, i wsp.** Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol.* . 101, 2006, Tom 2, 360.
127. **Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR.** Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology.* 2002 *Sep;123(3):689-99.* 123, 2002, Tom 3, 689-699.
128. **Koch, TR.** P-ANCA for ulcerative colitis management-hype or hope? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 485. 2002, Tom 97, 485.
129. **Guindi M, Riddell RH.** Indeterminate colitis. *J Clin Pathol.* 57, 2004, 1233-1244.

130. **Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern F Jr.** Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976, Tom 70, 439-444.
131. **Truelove SC, Witts LJ.** Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955, Tom 2, 1041-1048.
132. **Däbritz J, Musci J, Foell D.** Diagnostic utility of faecal biomarkers in patients with irritable bowel syndrome . *World J Gastroenterol* . 2014, Tom 20, 363-375.
133. **Zawada P., Szczepański M., Łykowska-Szuber L., Samara H., Linke K., Żeromski J.** Rola autooprzeciwciał w diagnostyce i różnicowaniu nieswoistych zapaleń jelit. *Alergia Astma Immunologia*. 2006, Tom 11, 155-161.
134. **Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, van de Veerdonk FL, de Jong DJ, Philpott DJ, van der Meer JW, Girardin SE, Joosten LA, Netea MG.** Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut*. 2011, Tom 60, 1229-1235.
135. **Lehrke M, Konrad A, Schachinger V, Tillack C, Seibold F, Stark R, Parhofer IG, Broedl UC.** CXCL16 is a surrogate marker of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008, Tom 43, 283-288.
136. **Shioya Y, Katakura K, Ohira H.** NEUTROPHIL ELASTASE INHIBITOR SUPPRESSES IL-17 BASED INFLAMMATION OF MURINE EXPERIMENTAL COLITIS. *Fukushima J Med Sci*. 2014, Epub ahead of print.
137. **Kuno Y, Ina K, Nishiwaki T, Tsuzuki T, Shimada M, Imada A, Nishio Y, Nobata K, Suzuki T, Ando T, Hibi K, Nakao A, Yokoyama T, Yokoyama Y, Kusugami K.** Possible involvement of neutrophil elastase in impaired mucosal repair in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2002, Tomy 3722-32, 3.
138. **Leach ST, Yang Z, Messina I, Song C, Geczy CL, Cunningham AM, Day AS.** Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2007, Tom 42, 1321-1331.
139. **Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R.** Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008, Tom 216, 183-192.

140. **Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M.** Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis.* 2008, Tom 14, 40-46.
141. **Derikx JP, Evennett NJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, van Bijnen AA, van Heurn LW, Buurman WA, Heineman E.** Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis. *Gut.* 2007, Tom 56, 1473-1475.
142. **Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW.** Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010, Tom 49, 1618-1631.
143. **Hoskin, TS.** Neutrophil Activation in Inflammatory Bowel Disease. *Thesis, Bachelor of Biomedical Sciences with Honours, University of Otago.* 2011, Retrieved from <http://hdl.handle.net/10523/2060>.
144. **Chmurzyńska, A.** The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006, Tom 47, 39-48.
145. **Cronk DR, Houseworth TP, Cuadrado DG, Herbert GS, McNutt PM, Azarow KS.** Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) for the detection of strangulated mechanical small bowel obstruction. *Curr Surg.* 2006, Tom 63, 322-325.
146. **Matsumoto S, Sekine K, Funaoka H, Yamazaki M, Shimizu M, Hayashida K, Kitano M.** Diagnostic performance of plasma biomarkers in patients with acute intestinal ischaemia. *Br J Surg.* 2014, Tom 101, 232-238.
147. **Derikx JP, Evennett NJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, van Bijnen AA, van Heurn LW, Buurman WA, Heineman E.** Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis. *Gut. 2007 Oct;56(10):1473-5.* 2007, Tom 56, 14730-1475.
148. **Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Cotte E, Peyras J, Cuerq C, Haybrard J, Charlois AL, Mialon A, Chauvenet M, Stroeymeyt K, Kaiserlian D, Draï J, Flourié B.** Neopterin is a novel reliable fecal marker as accurate as calprotectin for predicting endoscopic marker as accurate as calprotectin for predicting endoscopic disease activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2013, Tom 19, 1043-1052.
149. **Husain N, Tokoro K, Popov JM, Naides SJ, Kwasny MJ, Buchman AL.** Neopterin concentration as an index of disease activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol.* . 2013, Tom 47, 246-251.
150. **Prideaux L, De Cruz P, Ng SC, Kamm MA.** Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2012, Tom 18, 1340-1355.

151. **Bossuyt, X.** Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry*. 2006, Tom 52, 171-181.
152. **Jaskowski TD, Litwin CM, Hil HR.** Analysis of Serum Antibodies in Patients Suspected of Having Inflammatory Bowel Disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2006, Tom 13, 655-660.
153. **Kuna, AT.** Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochemia Medica*. 2013, Tom 23, 28-42.
154. **Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, Molnar K, Szabo D, Cseh A, Dezsofi A, Arato A, Veres G.** Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012, Tom 55, 429-435.