

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**



TOMASZ GOSIEWSKI

**OCENA FLORY BAKTERYJNEJ JELITA GRUBEGO
DZIECI Z PRZEWLEKŁYM ZAPALNIEM JELIT.**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum UJ

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Kraków, 2008

Składam Serdeczne Podziękowania:

Panu Prof. dr hab. med. Piotrowi Heczko

za opiekę naukową i gotowość do dzielenia się wiedzą,

Pani Dr Magdalenie Strus

za przychylność i wsparcie,

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii UJ CM

za wszelką udzieloną pomoc i okazaną życzliwość,

Moim Rodzicom

za ciągłe i nieustające wsparcie oraz motywację.

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----------|
| SPIS TREŚCI | 3 |
| INDEKS SKRÓTÓW | 6 |
| I. WSTĘP | 8 |
| 1.1 Rys historyczny. | 8 |
| 1.2 Przebieg kliniczny przewlekłych zapaleń jelit. | 9 |
| 1.2.1 Choroba Leśniowskiego – Crohna (CD). | 9 |
| 1.2.2 Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (<i>ulcerative colitis</i> , UC). | 10 |
| 1.2.3 Postać pośrednia – niespecyficzne, nieswoiste zapalenie jelit (<i>Indeterminate colitis</i> , IC). | 10 |
| 1.3 Epidemiologia przewlekłych zapaleń jelit. | 11 |
| 1.4 Patogeneza przewlekłych zapaleń jelit. | 12 |
| 1.4.1 Predyspozycje genetyczne. | 13 |
| 1.4.1.1 <i>NOD2/CARD15</i> | 13 |
| 1.4.1.2 <i>OCTN</i> | 15 |
| 1.4.1.3 <i>MDR1</i> | 16 |
| 1.4.1.4 Mutacje w genach <i>MUC</i> | 17 |
| 1.4.2 Rola układu immunologicznego. | 17 |
| 1.4.2.1 Specyfika jelitowego układu odpornościowego. | 17 |
| 1.4.2.2 Rola GALT w patogenezie przewlekłych zapaleń jelit. | 19 |
| 1.4.3 Czynniki środowiskowe. | 22 |
| 1.4.3.1 Wpływ bakteryjnej flory jelitowej. | 22 |
| 1.4.3.2 Wpływ innych czynników. | 26 |
| 1.5 Metody leczenia przewlekłych zapaleń jelit. | 27 |
| 1.5.1 Dieta. | 27 |
| 1.5.2 Leczenie farmakologiczne. | 27 |
| 1.5.2.1 Leczenie przeciwzapalne. | 27 |
| 1.5.2.2 Leczenie przeciwbakteryjne. | 28 |
| 1.5.2.3 Leczenie immunosupresyjne. | 29 |
| 1.5.3 Leczenie chirurgiczne. | 29 |
| 1.5.4 Zastosowanie probiotyków w IBD. | 30 |
| 2 CEL PRACY | 32 |
| 3 MATERIAŁY | 33 |
| 3.1 Charakterystyka pacjentów poddanych badaniu. | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2 | Charakterystyka badanych próbek. ----- | 35 |
| 4 | METODY ----- | 36 |
| 4.1 | Klasyczne metody oparte na hodowli bakterii. ----- | 36 |
| 4.1.1 | Ilościowy posiew bakteriologiczny próbek tkanki jelitowej oraz próbek kału.----- | 36 |
| 4.1.2 | Badanie degradacji mucyny przez florę kałową oraz przywartą do śluzówki jelita metodą płytkową (Zhou J.S. et al., 2001).----- | 37 |
| 4.2 | Metody biologii molekularnej. ----- | 39 |
| 4.2.1 | Ilościowe badanie bakteriologiczne przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ – FISH.----- | 39 |
| 4.2.1.1 | Badanie próbek tkanki jelitowej.----- | 39 |
| 4.2.1.2 | Badanie próbek kału.----- | 40 |
| 4.2.2 | Pomiar grubości warstwy śluzowej wytwarzanej przez śluzówkę jelita badanych pacjentów.----- | 43 |
| 4.2.3 | Porównanie składu gatunkowego bakterii jelitowych w próbkach pochodzących od pacjentów z CD, UC i z grupy kontrolnej, przy użyciu metody DGGE.----- | 44 |
| 4.2.3.1 | Izolacja DNA.----- | 44 |
| 4.2.3.2 | Amplifikacja PCR materiału genetycznego bakterii.----- | 45 |
| 4.2.3.3 | Elektroforeza DGGE.----- | 46 |
| 4.3 | Cyfrowe metody uzyskiwania wyników i metody statystyczne. ----- | 48 |
| 5 | WYNIKI ----- | 50 |
| 5.1 | Ogólna liczba przebadanych próbek. ----- | 50 |
| 5.2 | Jakościowa i ilościowa ocena składu bakteryjnej flory jelitowej u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. ----- | 52 |
| 5.2.1 | Udział procentowy zawartości bakterii w poszczególnych typach badanych próbek.----- | 52 |
| 5.2.1.1 | Tkanka jelitowa.----- | 52 |
| 5.2.1.2 | Próbki kału.----- | 58 |
| 5.2.2 | Udział procentowy zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w poszczególnych typach badanych próbek.----- | 66 |
| 5.2.2.1 | Tkanka jelitowa.----- | 66 |
| 5.2.2.2 | Próbki kału.----- | 69 |
| 5.3 | Porównanie składu gatunkowego bakterii jelitowych zawartych w próbkach pochodzących od pacjentów z CD, UC i z grupy kontrolnej przy użyciu metody DGGE. ----- | 75 |
| 5.4 | Ocena warstwy śluzu jelitowego. ----- | 77 |
| 5.4.1 | Pomiar grubości warstwy śluzowej wytwarzanej przez śluzówkę jelita badanych pacjentów.----- | 77 |
| 5.4.2 | Badanie degradacji mucyny metodą płytkową przez florę kałową oraz przywartą do śluzówki jelita.----- | 79 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6 | DYSKUSJA | 82 |
| 6.1 | Flora bakteryjna jelitowej błony śluzowej. | 83 |
| 6.2 | Kałowa flora bakteryjna. | 85 |
| 6.2.1 | Metoda posiewu bakteriologicznego. | 85 |
| 6.2.2 | Metoda FISH. | 87 |
| 6.3 | Relacje pomiędzy beztlenową a tlenową florą bakteryjną. | 88 |
| 6.4 | Śluz jelitowy a flora bakteryjna. | 91 |
| 6.5 | Podsumowanie. | 93 |
| 7 | WNIOSKI | 94 |
| 8 | STRESZCZENIE | 95 |
| 9 | SUMMARY | 97 |
| 10 | WYKAZ ZAŁACZNIKÓW | 99 |
| 10.1 | Wykaz rycin. | 99 |
| 10.2 | Wykaz tabel. | 102 |
| 10.3 | Karty pracy. | 104 |
| 11 | PIŚMIENNICTWO | 109 |

INDEKS SKRÓTÓW

| | |
|-------------------------------|--|
| 5-ASA | kwask 5 - aminosalicylowy |
| AIEC | Adherent-invasive <i>Escherichia coli</i> |
| APS | nadsiarczan amonu |
| AZA | azatiopryna |
| CARD15 | caspase recruitment domain family, member 15 |
| CD | Crohn`s Disease |
| CY3 | cyjan 3 |
| DAPI | 4',6-diaminoino-2-fenylindol |
| dATP | deoksy-adenozynotryfosforan |
| dCTP | deoksy-cytydynotryfosforan |
| ddH₂O | podwójnie destylowana woda |
| DGGE | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| dGTP | deoksy-guaninotryfosforan |
| DSS | siarczan dekstranu sodu |
| dTTP | deoksy-tymidynotryfosforan |
| FISH | Fluorescent In Situ Hybridization |
| FITC | izotiocyanian fluoresceiny |
| GALT | gut-associated lymphoid tissue |
| IBD | Inflammatory Bowel Disease |
| IC | Indeterminate colitis |
| IL | interleukina |
| INFγ | Interferon gamma |
| LPS | Lipopolisacharyd bakteryjny (endotoksyna) |
| LRR | Leucine-Rich Repeats |
| MAA | lektyna z <i>Maackia amurensis</i> |
| MDR1 | Multidrug resistance 1 |
| MMF | mykofenolan mofetylu |
| MUC | gen mucyny |

| | |
|--------------|--|
| NOD2 | nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 |
| OCTN | Organic Cation Transporter |
| PBS | buforowana sól fizjologiczna |
| PCR | reakcja łańcuchowej polimerazy |
| SASP | sulfasalazyna |
| TAE | Tris-Acetate-EDTA |
| TBE | Tris/Borate/EDTA bufor |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine |
| TGFβ | Transforming Growth Factor beta |
| Th1 | T helper 1 cells |
| Th2 | T helper 2 cells |
| Th3 | T helper 3 cells |
| TLR | Toll Like Receptor |
| TNFα | Tumor Necrosis Factor alfa |
| UC | Ulcerative colitis |

1. WSTĘP

1.1 Rys historyczny.

Przewlekłe zapalenia jelit prawdopodobnie nękały ludzkość od zarania dziejów. Kiedy tylko nauka, dzięki pracom Antoniego Leeuwenhoeka w XVIII wieku, a następnie Ludwika Pasteura w 100 lat później, odkryła świat mikroorganizmów i udowodniła ich związki z wieloma chorobami ludzie zaczęli doszukiwać się przyczyn tych dolegliwości w infekcjach - tendencja ta istnieje także dziś (de Kruif P., 1956). Mimo to pojawiali się badacze, którzy opisywali zmiany morfologiczne w ścianie jelit objętych procesem chorobowym. Zmiany te były charakterystyczne dla przewlekających się stanów zapalnych, toczących się w przewodzie pokarmowym, głównie w jego dystalnej części. Już w 1761 roku włoski anatom Giovanni Battista Morgagni opisał przypadek 34-letniego mężczyzny z naciekami zapalnymi jelita cienkiego i jelita grubego oraz z owrzodzeniami, zwężeniami i powiększonymi węzłami chłonnymi krezki. Podobne zmiany chorobowe opisywali również inni autorzy jak Samuel Wilks, który w 1859 roku wprowadził do nomenklatury medycznej termin *ulcerative colitis* (UC), określający przypadki ciężkich owrzodzeń w obrębie okrężnicy, u pacjentów z obfitymi, krwawymi biegunkami (Kirsner J. B., 1988).

W literaturze medycznej termin **przewlekły stan zapalny jelit**, określany także jako IBD (*ang. Inflammatory Bowel Disease*) na dobre funkcjonuje jednak od 1932 roku, kiedy to nowojorski lekarz Burrill B. Crohn wraz z kolegami: Leonem Ginzburgiem i Gordonem D. Oppenheimerem publikują pracę w której przedstawiają nową jednostkę chorobową o nazwie „regional ileitis” - od tego momentu medycyna zna tę chorobę jako chorobę Crohna (*ang. Crohn`s disease, CD*) (Crohn B.B. et al., 1932; Aufses A. H., 2000).

Na długo przed opublikowaniem przez Crohna jego pracy, w Polsce warszawski lekarz Antoni Leśniowski wielokrotnie opisuje przypadki

przewlekających się stanów zapalnych jelit, z zaznaczającymi się zmianami zapalnymi śluzówki jelita oraz powiększonymi, okolicznymi węzłami chłonnymi, a także przetokami (Leśniowski A., 1903; Lichtarowicz A. M. and Mayberry J. F., 1988). Z tego powodu w polskiej literaturze medycznej przyjęto się określać CD, jako **chorobę Leśniowskiego – Crohna**.

1.2 Przebieg kliniczny przewlekłych zapaleń jelit.

Przewlekłe zapalenia jelit, zwane także nieswoistymi zapaleniami jelit lub w skrócie IBD są schorzeniami przewodu pokarmowego o podłożu zapalnym, lecz o nieznannej etiologii.

W obrębie IBD wyróżnia się trzy oddzielne jednostki chorobowe dające odmienne objawy kliniczne oraz obejmujące inne partie przewodu pokarmowego (Muszyński J., 2001).

1.2.1 Choroba Leśniowskiego – Crohna (CD).

Jest to przewlekła choroba zapalna mogąca dotyczyć każdej części przewodu pokarmowego, począwszy od jamy ustnej aż do odbytu.

Manifestowane objawy zależą od miejsca lokalizacji zmian zapalnych; generalnie można wyróżnić: bóle brzucha (zwykle w prawym dole biodrowym), wzdęcia, utratę masy ciała, osłabienie i stany gorączkowe. Obserwuje się także powstawanie przetok i ropni okołoodbytniczych.

Zmiany zapalne w przewodzie pokarmowym mają charakter nieciągły, co oznacza, że obok zmienionej zapalnie błony śluzowej występuje niezmienną zapalnie. Ponadto, zmiany zapalne oprócz błony śluzowej, obejmują także wszystkie pozostałe partie ściany jelita.

W obrazie histologicznym dominuje ziarnina z komórek nabłonkowych oraz wielojądrowe komórki olbrzymie.

1.2.2 Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*, UC).

Podobnie jak CD, jest to przewlekła choroba zapalna, ale dotyczy jedynie okrężnicy.

Do objawów można zaliczyć częste biegunki z domieszką krwi i (lub) śluzu oraz bolesne parcie na stolec. Przetoki i ropnie występują rzadko.

Zmiany zapalne o charakterze ciągłym lokalizują się na całej długości jelita grubego w postaci powierzchniowych owrzodzeń.

W obrazie histologicznym widoczne są nacieki granulocytarne oraz limfocytarne błony śluzowej. W zaawansowanym stadium, tj. po ok. 10 latach trwania choroby mogą pojawiać się zmiany o charakterze dysplazji nabłonka prowadzące do zwyrodnienia nowotworowego (Huser W. et al., 2007).

1.2.3 Postać pośrednia – niespecyficzne, nieswoiste zapalenie jelit (*Indeterminate colitis*, IC).

Jest to postać IBD o charakterze pośrednim pomiędzy CD, a UC. Brak jest typowych objawów klinicznych. Podobnie, nie ma charakterystycznych zmian w obrazie makroskopowym i histopatologicznym.

Objawy ze strony przewodu pokarmowego w przebiegu IBD są najbardziej charakterystyczne dla tych schorzeń. Dodatkowo jednak mogą pojawiać się również manifestacje pozajelitowe IBD, np. rumień guzowaty, zapalenie stawów, zapalenie twardówki oka, zapalenie osierdzia, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie naczyń i zmiany zakrzepowo – zatorowe oraz inne (Muszyński J., 2001).

1.3 Epidemiologia przewlekłych zapaleń jelit.

Zapadalność na IBD jest zróżnicowana w zależności od lokalizacji geograficznej danej populacji i uzależniona jest od stopnia rozwoju socjoekonomicznego społeczeństwa (Loftus E. V., 2004). Generalnie obserwuje się zwiększoną zapadalność na poszczególne postacie IBD w krajach wysoko rozwiniętych oraz mniejszą w krajach o niższym stopniu rozwoju socjoekonomicznego. Daje się także zauważyć rosnącą ilość zachorowań na IBD w państwach Azji, Ameryki Południowej oraz wschodniej Europy, w tym i w Polsce, gdzie zachodzi dynamiczny proces postępu cywilizacyjnego i gospodarczego (Lakatos P., 2006; Lakatos L. and Lakatos P. L., 2006).

W ostatnich latach obserwuje się prawie dwukrotne zwiększenie zapadalności na przewlekłe zapalenia jelit (Lindberg E. et al., 2000). Wzrost zachorowalności dotyczy zarówno pacjentów chorych na UC (z 1,4/100 000 osób/rok do 3,2/100 000 osób/rok), jak i CD (z 1,3/100 000 osób/rok do 3,11/100 000 osób/rok) (Lakatos P., 2006; Lindberg E. et al., 2000; Cosgrove M. et al., 1996).

W przypadku dzieci rozpoznanie przypadków IBD jest utrudnione z uwagi na pojawiające się nietypowe objawy. Jedynie ok. 25% dziecięcych pacjentów z CD wykazuje klasyczne objawy, tzn. bóle brzucha, biegunki i utratę masy ciała. Z tego powodu prawidłowa diagnoza we wczesnym okresie dzieciństwa często jest utrudniona (Ravikumara M. and Sanhu B. K., 2006). Obserwuje się również obniżenie wieku wystąpienia objawów klinicznych IBD u dzieci, u których pojawiają się one obecnie ok. 14 rok życia (Lee J. C. et al., 1999; Gryboski J. D., 1994; Langholz E. et al., 1997). Podobnie jak to ma miejsce w przypadku pacjentów dorosłych, także wśród dzieci obserwuje się wzrost zachorowalności na przewlekłe zapalenia jelit. (Lindberg E. et al., 2000; van der Zaag-Loonen H. J., 2004).

Liczba przypadków IBD wśród dzieci w krajach zachodniej Europy wynosi 7,4/100 000 osób/rok, dla CD 4,9/100 000 osób/rok, dla UC 2,2/100 000 osób/rok, a dla IC 0,2/100 000 osób/rok (Hildebrand H. et al., 2003). W USA

zachorowalność na IBD wynosi 7,05/100 000 osób/rok, dla CD 4,56/100 000 osób/rok, zaś dla UC 2,14/100 000 osób/rok (Kugathasan S., 2003).

W Polsce brak jest kompletnych danych epidemiologicznych, ale Wiercińska-Drapało i wsp donoszą, że dominują zachorowania na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (94%), zaś zachorowania na chorobę Leśniowskiego-Crohna to ok. 6% przypadków (Wiercinska-Drapało A. et al., 2005).

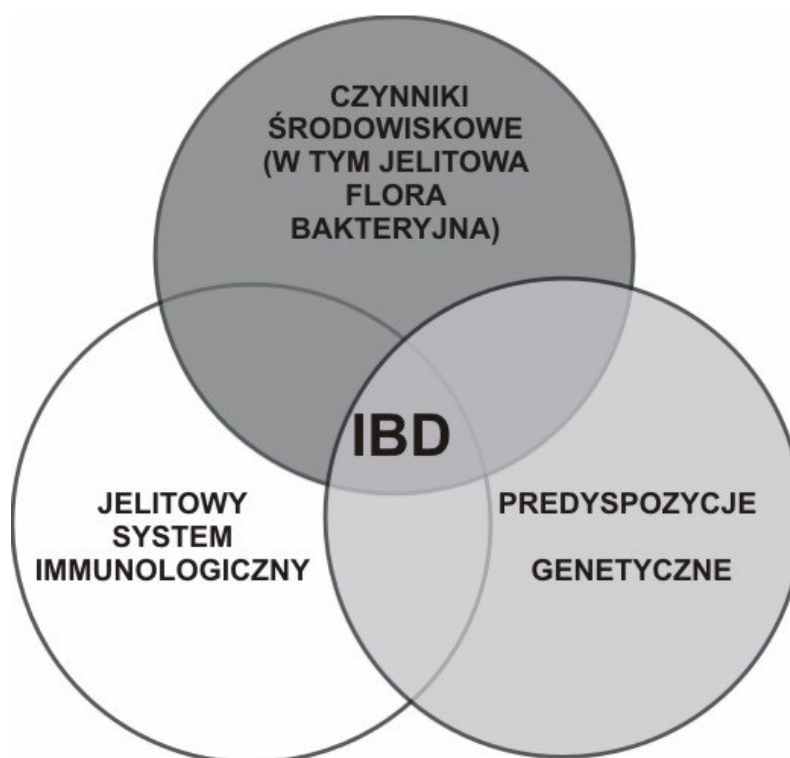
W Polsce zapadalność na IBD wśród dzieci wynosiła w latach 2002 – 2004 1,22/100 000 osób/rok, w tym na CD 0,28/100 000 osób/rok, na UC 0,63/100 000 osób/rok oraz na IC 0,31/100 000 osób/rok (Karolewska-Bochenek K., 2004).

Przeprowadzona analiza retrospektywna dotycząca zachorowalności na IBD na obszarze Polski południowej potwierdza światowy trend, tzn. wzrost liczby zachorowań (z 0,65/100 000 osób/rok w latach 1992-96 do 1,14/100 000 osób/rok w latach 1996-2000) oraz obniżenie wieku występowania objawów (Jedynak-Wąsowicz U. et al., 2005).

1.4 Patogeneza przewlekłych zapaleń jelit.

Etiologia przewlekłych zapaleń jelit pozostaje nadal niewyjaśniona. Niewątpliwie są to schorzenia o podłożu zapalnym, na co wskazuje obraz histologiczny tkanek pobranych z przewodu pokarmowego osób chorych, nadal jednak pozostaje pytanie o przyczynę tych zmian (Hauser W. et al., 2007).

Oprócz aktywności jelitowego systemu immunologicznego, postulowane są także predyspozycje genetyczne, wpływ komensalnej, bakteryjnej flory jelitowej, a także ewentualny udział czynników środowiska zewnętrznego, jak np. palenie tytoniu (rycina 1).



Rycina 1 Czynniki predysponujące do zachorowania na IBD.

1.4.1 Predyspozycje genetyczne.

Wyniki badań sugerują wpływ czynników genetycznych związanych z mutacjami wielu genów na zachorowalność oraz na przebieg IBD. Ciągłe opisywane są nowe mutacje które są związane z przewlekłymi zapaleniami jelit. O ile jednak zmiany w genomie chorych na IBD są identyfikowane, o tyle określenie funkcji zmutowanych genów przysparza trudności. Mimo to udało się odkryć i opisać kilkanaście mutacji, których związek z IBD może być istotny, a najważniejsze z nich opisano poniżej (Van Limbergen J. et al., 2007a).

1.4.1.1 *NOD2/CARD15*.

Najwcześniej odkryta i najlepiej do tej pory poznana jest mutacja w genie *NOD2* zlokalizowanym na 16 chromosomie ludzkiego genomu. Została ona opisana niemal równocześnie przez dwie niezależne grupy badacze (Hugot J. P.

et al., 2001; Ogura Y. et al., 2001a). Gen ten, jak się później okazało, zawiera sekwencję wiążącą kaspazy, więc z tego powodu zmieniono jego nazwę na *CARD15* i obecnie w literaturze fachowej spotyka się obie nazwy (Mathew C. G. and Lewis C. C., 2004).

Dziki gen *CARD15* koduje białko składające się z trzech funkcjonalnych domen (Ogura Y. et al., 2001b). C terminalna część zawiera domenę bogatą w reszty leucytowe (LRR), ważną w rozpoznawaniu antygenów, przez co może ona indukować odpowiedź immunologiczną. Środkowa część jest oligomerową proteiną; N terminalna część to dwie CARD domeny, pełniące ważną rolę w indukcji apoptozy oraz w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Hugot J. P., 2006).

CARD15 ulega ekspresji między innymi w komórkach Panetha w świetle jelita i jest niewątpliwie związany z nieswoistymi mechanizmami odporności (Berrebi D. et al., 2003). Jego rola sprowadza się głównie do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, aktywującego transkrypcję genów cytokin prozapalnych takich jak TNF α IL-8 czy INF γ (Yasunori O. et al., 2001).

Aktywacja *CARD15* może odbywać się poprzez interakcje z lipopolisacharydem (LPS) lub peptydoglikanem bakteryjnym lub innymi komponentami komórki bakteryjnej. Zatem drobnoustroje mogą oddziałując poprzez gen *CARD15* indukować stan zapalny, co potwierdzono w badaniach *in vitro* (Inohara N. et al., 2003). W badaniach prowadzonych *in vitro* na liniach komórkowych szczepu mysiego *CARD15*^{-/-} (wyłączony gen), udowodniono że prawidłowy gen *NOD2* oddziałuje hamująco na odpowiedź zapalną typu T_h1, mediowaną przez Toll-like 2 receptor (TLR2) oraz że hamuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wskutek tego nie dochodzi do produkcji cytokin prozapalnych takich jak TNF α i INF γ oraz do dojrzewania makrofagów. Zatem dzika wersja tego genu zapobiega wzbudzaniu stanu zapalnego (Watanabe T. et al., 2004).

Prawdopodobnie dzika wersja genu *CARD15* funkcjonuje jako bramka, która pozwala na zahamowanie odpowiedzi immunologicznej w stosunku do komensalnej flory bakteryjnej jelita oraz pobudza odpowiedź zapalną poprzez aktywację czynnika NF- κ B kiedy pojawią się bakterie patogenne. W przypadku mutacji genu ten mechanizm zawodzi i może dochodzić do pojawienia się

odpowiedzi zapalnej nawet wtedy, gdy w jelicie bytuje jedynie komensalna flora bakteryjna.

Wszystkie warianty mutacji w genie *CARD15* zostały do tej pory stwierdzone u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, natomiast nie potwierdzono ich u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, ani z innymi klinicznymi formami IBD. (Mathew C. G. and Lewis C. C., 2004; Hugot J. P., 2006).

Istnieje kilka wariantów mutacji opisywanego genu. Dany pacjent może mieć jeden zmutowany allel genu *NOD2*, ale może mieć także oba. Ryzyko zachorowania na CD u heterozygot jest ok. 2 – 3 razy wyższe niż u osób bez mutacji. U homozygot ryzyko to jest 20 – 40 razy wyższe (Mathew C. G. and Lewis C. C., 2004; Hugot J. P., 2006; Riis L. et al., 2007), z drugiej strony mutacje te występują też u ok. 10% osób bez CD.

Genem homologicznym do genu *NOD2/CARD15* jest gen nazwany *NOD1/CARD4*. Oba geny mają bardzo podobne struktury genetyczne, jednak ten drugi jest ulokowany na 7 chromosomie (Van Limbergen J. et al., 2007b; Giallourakis C. et al., 2003). Przeprowadzone dotychczas badania nie potwierdziły związków pomiędzy mutacjami w opisywanym genie, a zachorowalnością na IBD (Van Limbergen J. et al., 2007b; Zouali H. et al., 2003).

1.4.1.2 *OCTN*.

Kolejne mutacje mające związek z zapadalnością na przewlekłe zapalenia jelit zidentyfikowano na 5 chromosomie ludzkiego genomu. Dwie proteiny (*OCTN1* i *OCTN2*) kodowane przez dwa warianty genów: *SLC22A4* i *SLC22A5*, są odpowiedzialne za transport kationów organicznych (głównie karnityny oraz innych substancji) przez błonę komórkową (Abreu M. T. and Sparrow M. P., 2006; Peltekova V. D. et al., 2004).

W genie *SLC22A4* stwierdzono nonsensowną mutację punktową polegającą na substytucji nukleotydu cytozynowego, tymidynowym. Zmiana ta ma miejsce w sekwencji kodującej białko pompy kationowej i prowadzi do ekspresji wadliwie działającego transportera transbłonowego.

W przypadku genu *SLC22A5* opisano również mutację punktową, polegającą na zamianie nukleotydu guaninowego na cytozynowy. Mutacja ta ma miejsce w sekwencji promotorowej genu i prowadzi do przerwania ciągłości sekwencji elementu białka szoku cieplnego, które jest niezbędne w procesie formowania się transportera transbłonowego (Peltekova V. D. et al., 2004).

Mutacje te mogą powodować zredukowanie transportu karnityny w komórkach epitelialnych nabłonka jelit, co upośledza procesy utleniania komórkowego, a zatem zmniejsza możliwości obronne komórek poprzez wybuch tlenowy (Roediger W. E. and Nance S., 1986).

Obie opisane mutacje (tzw. haplotyp TC) występują u 19% heterozygot i u 27% homozygot z CD. Ryzyko zachorowania na chorobę Leśniowskiego-Crohna w przypadku heterozygot TC jest ponad 2 razy większe niż wśród osób bez mutacji. U homozygot TC, jest ono ponad 3 razy wyższe, zaś u osób z jednoczesną mutacją w genie *CARD15*, jest ponad siedmiokrotnie większe, niż u osób bez tych mutacji (Peltekova V. D. et al., 2004).

W przeciwieństwie do mutacji w genie *CARD15*, mutacje w genach *SLC22A4* i *SLC22A5* mogą mieć zarówno wpływ na zachorowalność na CD, jak i na UC (Giallourakis C. et al., 2003).

1.4.1.3 *MDR1*

Jest to gen zlokalizowany na 7 chromosomie. Koduje on transbłonowy transporter, tzw. P-glikoproteinę 170, która stanowi pompę usuwającą ksenobiotyki z jelitowych komórek nabłonkowych, co umożliwia ich detoksyfikację (Annese V. et al., 2006). Na modelu mysim wykazano, że znokautowanie genu *MDR1* prowadzi do rozwinięcia się stanu zapalnego jelit, wskutek gromadzenia się w komórkach substancji toksycznych (Schwab M. et al., 2003).

Nie ma jednoznacznych danych świadczących o wpływie tej mutacji na zachorowalność na IBD, jednak niektórzy autorzy wskazują na jej związek z zapadalnością na UC (Schwab M. et al., 2003; Croucher P. J. P. et al., 2003; Brant S. R. et al., 2003). W przypadku choroby Leśniowskiego – Crohna nie potwierdzono jak do tej pory, aby mutacje w genie *MDR1* miały związek z zachorowalnością na tę jednostkę chorobową (Onnie C. M. et al., 2006).

1.4.1.4 Mutacje w genach *MUC*.

Śluz jelitowy działa jako bariera ochronna dla nabłonka jelitowego przed bezpośrednim kontaktem z florą bakteryjną oraz jako substancja ułatwiająca pasaż treści pokarmowej w świetle jelit. Śluz jelitowy składa się z glikoprotein nazywanych mucynami, które są kodowane przez szereg genów *MUC* - opisano do tej pory ponad 20 tych genów (Porchet N. and Aubert J. P., 2004).

W IBD obserwuje się zmniejszenie grubości warstwy śluzowej wyściełającej światło jelita w porównaniu do występującej u osób zdrowych, przez co dochodzi do bezpośredniego kontaktu treści jelitowej z nabłonkiem, co indukuje proces zapalny (Pullan R. D. et al., 1994).

Na modelu zwierzęcym wykazano, że u myszy z wyłączonym genem *MUC2* zmniejszenie produkcji mucyny w porównaniu do grupy kontrolnej z aktywnym genem, prowadziło do zapalenia jelit po podaniu zwierzętom siarczanu dekstranu sodu (DSS) (Van der Sluis M. et al., 2006).

Przeprowadzono badania stężenia transkryptów mRNA genów *MUC1* i *MUC3*, w wyniku których stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji tych genów u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (Myerscough N. et al., 1995). U pacjentów z CD potwierdzono obniżenie stopnia ekspresji genów *MUC3*, *MUC4* i *MUC5B* zarówno w śluzówce jelita zmienionej zapalnie, jak i w niezmienionej chorobowo w porównaniu do grupy kontrolnej pacjentów, podczas gdy, poziom *MUC1* mRNA był zredukowany wyłącznie w śluzówce zmienionej zapalnie (Buisine M. P. et al., 1999).

1.4.2 Rola układu immunologicznego.

1.4.2.1 Specyfika jelitowego układu odpornościowego.

Rola układu immunologicznego w każdym organizmie, który go posiada polega na stanowieniu bariery ochronnej przed zewnętrznymi czynnikami patogennymi, a także czynnikami endogennymi jak np. komórki nowotworowe. Aby system obrony mógł skutecznie pracować musi posiadać zdolność do

natychmiastowego działania w przypadku pojawienia się w ustroju czynnika patogenego, zazwyczaj w postaci mikroorganizmu. Taka natychmiastowa reakcja jest możliwa dzięki systemowi nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, który jest wrodzony. Ta pierwsza linia obrony jest oparta głównie na komórkach fagocytujących, takich jak makrofagi i granulocyty. Umożliwia ona przygotowanie bardziej skutecznej oraz precyzyjnej obrony w postaci swoistej odpowiedzi immunologicznej złożonej z komponentu humoralnego oraz komórkowego.

Bardzo szybka reakcja na pojawienie się antygeny zwiększa szanse na jego eliminację z ustroju, zatem zdolność do szybkiego reagowania jest bardzo korzystną cechą układu immunologicznego, umożliwiającą wykrycie i zniszczenie najmniejszej nawet liczby czynników patogennych. Taki system sprawdza się doskonale w przypadku całego organizmu za wyjątkiem przewodu pokarmowego, który jest skolonizowany – zwłaszcza w swojej dystalnej części – przez olbrzymią liczbę mikroorganizmów należących do flory komensalnej. Flora ta składa w przeważającej liczbie z komórek bakteryjnych, które w każdym miejscu ludzkiego organizmu, innym niż przewód pokarmowy, wywołałyby gwałtowną reakcję układu immunologicznego. Wynika z tego wniosek, że lokalny układ odpornościowy przewodu pokarmowego działa na innych zasadach niż pozostała część ogólnoustrojowego systemu immunologicznego i raczej hamuje swoją odpowiedź na obecność antygenów niż ją promuje (Abreu M. T. and Sparrow M. P., 2006; Braat H. et al., 2006; Chandran P. et al., 2003).

Jelitowy układ odpornościowy GALT (ang Gut – associated lymphoid tissue), różni się znacząco od ogólnoustrojowego systemu immunologicznego. Zawiera on wyspecjalizowane intraepitelialne limfocyty oraz epitelialne komórki prezentujące antygen, których nie ma w żadnym innym miejscu ludzkiego ciała (Mayer L., 2000). Dodatkowo, obecne są w jelicie cienkim także tzw. kępki Peyera, czyli skupiska tkanki limfoidalnej składającej się z limfocytów B oraz limfocytów T. Błona śluzowa okrywająca kępki Peyera jest złożona z wyspecjalizowanych komórek epitelialnych nazwanych komórkami M. Nie są one - w odróżnieniu od pozostałych komórek budujących nabłonek jelitowy - pokryte śluzem z powodu braku przyległych komórek kubkowych, co powoduje, że możliwy jest kontakt antygenów z apikalnymi częściami komórek M. Rolą komórek M jest przekazywanie antygenów komórkom układu immunologicznego w celu wywołania odpowiedzi odpornościowej. W prawidłowo działającym systemie składniki

komensalnej flory bakteryjnej jelita nie adherują do komórek M, co zapobiega odpowiedzi zapalnej. W przypadku pojawienia się w przewodzie pokarmowym bakterii patogennych, komórki M biorą udział w przekazaniu ich antygenów komórkom limfocytarnym kępek Peyera oraz komórkom dendrytycznym, które prezentują antygeny limfocytom T, co z kolei prowadzi do rozwinięcia odpowiedzi odpornościowej, także zapalnej (Owen R. L. et al., 1986; Hart A. L. et al., 2005).

1.4.2.2 Rola GALT w patogenezie przewlekłych zapaleń jelit.

Jak wspomniano powyżej, przewód pokarmowy jest skolonizowany przez bogatą florę bakteryjną, która zawiera wiele potencjalnie patogennych mikroorganizmów. Jeśli jelitowy układ odpornościowy działa prawidłowo, komórki bakterii stanowiących florę komensalną jelit nie pobudzają odpowiedzi immunologicznej GALT.

IBD jest zespołem schorzeń o podłożu zapalnym, na co wskazują objawy kliniczne, obecność markerów stanu zapalnego oraz zmiany o charakterze zapalnym obserwowane w tkance jelitowej.

Pierwszym ogniwem łańcucha prowadzącego do rozwinięcia odpowiedzi zapalnej GALT przeciwko składnikom własnej komensalnej flory bakteryjnej może być zmniejszenie grubości warstwy śluzu pokrywającej od wewnątrz ścianę jelita. Powoduje to zwiększenie prawdopodobieństwa bezpośredniego kontaktu antygenów bakteryjnych z powierzchnią nabłonka jelitowego, co z kolei może doprowadzić do indukcji odpowiedzi immunologicznej (Pullan R. D. et al., 1994; Sonnenburg J. L. et al., 2004). Kolejnym mechanizmem, który to umożliwia może być rozluźnienie tzw. połączeń ścisłych (ang. tight junctions) pomiędzy poszczególnymi komórkami nabłonka jelitowego. Zwiększają one przyleganie komórek do siebie, a tym samym uszczelniają nabłonek przez co zmniejszają ryzyko przeniknięcia patogenu w głąb tkanki (Ganz T., 2003; Owen R. L. et al., 1986).

Odpowiedź GALT na antygeny ekspozowane na komórkach prezentujących antygen, np. na komórkach dendrytycznych, jest sterowana przez oddziaływanie różnych cytokin zarówno pro- jak i antyzapalnych. Ponadto, nieodróżnicowane

(naiwne) limfocyty T przekształcają się pod wpływem antygenów prezentowanych przez komórki dendrytyczne w limfocyty T pomocnicze T_{h1} , T_{h2} pełniące funkcję efektorową lub w limfocyty pomocnicze T_{h3} , które są odpowiedzialne za regulowanie intensywności odpowiedzi immunologicznej (Kapsenberg M. L., 2003). Nadmiar limfocytów efektorowych prowadzi do nadprodukcji prozapalnych cytokin, podczas gdy zwiększenie się populacji limfocytów regulatorowych może prowadzić do rozwinięcia się tolerancji immunologicznej (Abreu M. T. and Sparrow M. P., 2006).

W przebiegu przewlekłych zapaleń jelit, dominuje w odróżnieniu od stanu prawidłowego, typ odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T_{h1} , a więc komórkowej. Rozwija się ona wskutek oddziaływania interleukin: IL-12, IL-18 lub IL-23 na limfocyty T_{h1} , które następnie produkują cytokiny: IL-2 oraz interferon gamma $INF\gamma$, które z kolei aktywują makrofagi do sekrecji IL-1, IL-6 i czynnika martwicy nowotworów $TNF\alpha$ (Braat H. et al., 2006; Thompson-Chagoyan O. C. et al., 2005; Fuss I. J., 2003). Natomiast wykazano, że zwiększenie populacji limfocytów T_{h3} , które wydzielają duże ilości antyzapalnych cytokin: IL-10 oraz czynnika wzrostu nowotworów $TGF\beta$, może zapobiegać procesowi zapalnemu jelit (Groux H. A. and Bigler O. M., 1997).

Wydaje się, że największą rolę w immunopatogenezie IBD odgrywa $TNF\alpha$. Jest to cytokina o silnych właściwościach prozapalnych inicjująca wraz z innymi cytokinami kaskadę procesu zapalnego, która prowadzi w rezultacie do pojawienia się typowych objawów zapalenia jelit, np. biegunki, czy uszkodzenia błony śluzowej jelita (Papadakis K. A. and Targan S. R., 2000)

U zwierząt z indukowanym IBD oraz u pacjentów z IBD leczonych za pomocą przeciwciał anti- $TNF\alpha$, obserwuje się znaczne złagodzenie objawów klinicznych choroby oraz wchodzenie w stan remisji (Targan S. R. et al., 1997; Hauser W. et al., 2007). Z drugiej strony, u myszy z nadekspresją genu kodującego $TNF\alpha$, stwierdzono w przewodzie pokarmowym rozwój zmian podobnych fenotypowo do choroby Crohna (Kontoyiannis D. et al., 1999).

Opisano także kilkudziesięciokrotny wzrost poziomu ekspresji genu kodującego tę cytokinę (mierzony ilością transkryptów mRNA oraz stężeniem $TNF\alpha$) w śluzówce jelit pacjentów z IBD w porównaniu do osób z grupy kontrolnej

bez IBD (Noguchi M. et al., 1998; Papadakis K. A. and Targan S. R., 2000). Stwierdzono, że u dzieci w aktywnej fazie IBD w błonie śluzowej jelit istotnie wzrasta ilość komórek wydzielających $TNF\alpha$, z tym że większą ich liczebność wykryto u pacjentów z CD niż z UC. W fazie remisji nie było istotnych różnic pomiędzy grupą dzieci z IBD, a grupą kontrolną (Breese E. et al., 1994).

Także w osoczu pacjentów z IBD odnotowano zmiany stężenia tej cytokiny. U osób z CD w aktywnej fazie poziom czynnika martwicy nowotworu jest ok. 640 razy wyższy niż w grupie kontrolnej, zaś u pacjentów z UC, także będących w fazie aktywnej, jest on ok. 380 razy wyższy (Komatsu M. et al., 2001).

Postuluje się udział w patogenezie IBD także innych cytokin, poza $TNF\alpha$. Jedną z nich jest IL-17 produkowana przez specyficzne limfocyty T_{IL-17} oraz przez monocyty i makrofagi. IL-17 jest prawdopodobnie cytokiną o działaniu prozapalnym. Odnotowano, że jej stężenie zarówno w surowicy jak i w tkance jelitowej osób z CD i z UC, wzrasta w stosunku do stężenia u osób zdrowych.

IL-17 aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B, co pociąga za sobą indukcję syntezy cytokin prozapalnych np. $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β . Ponadto dochodzi do wzmożonej syntezy tlenu azotu. W IBD poziom IL-17 w surowicy i w tkance jelitowej koreluje pozytywnie z fazą aktywności choroby (Fujino S. et al., 2003). Stosując model myszy wykazano, że u zwierząt z wyłączonym genem kodującym IL-10, u których spontanicznie rozwija się stan zapalny jelit, podanie przeciwciał monoklonalnych anti-IL-17 zapobiega zapaleniu (Yen D. et al., 2006).

Interleukiny IL-12 oraz IL-23 aktywują odpowiedź immunologiczną typu T_h1 , a także stymulują produkcję IL-17 i IL-6, co prowadzi do rozwoju i utrzymania przewlekłego stanu zapalnego (Trinchieri G., 2003). Eksperymentalne zastosowanie monoklonalnych przeciwciał anti-IL-12 u ludzi z CD powodowało wejście w stan remisji (Mannon P. J. et al., 2004). Podobne efekty uzyskano na tym samym modelu mysim, w którym podawanie monoklonalnych przeciwciał przeciwko podjednostce p40 IL 12 i IL-23 powodowało zmniejszenie odczynu zapalnego jelit (Davidson N. J. et al., 1998).

1.4.3 Czynniki środowiskowe.

1.4.3.1 Wpływ bakteryjnej flory jelitowej.

Rola komensalnej flory bakteryjnej jelita w patogenezie IBD.

Komensalna flora bakteryjna jelita odgrywa istotną rolę w procesie trawienia i przyswajania składników pokarmowych oraz wykazuje działanie ochronne przed inwazją mikroorganizmów patogennych poprzez tworzenie oporności na kolonizację i oddziaływanie na system immunologiczny organizmu gospodarza (Simon G. L. and Gorbach S. L., 1984). Liczba komórek bakteryjnych zasiedlających ludzkie jelito wynosi około 10^{14} , czyli 100 trylionów. W jednym mililitrze treści jelitowej znajduje się ok. 10^{11} komórek bakterii (Ley R. E. et al., 2006).

W skład mikroflory przewodu pokarmowego wchodzi głównie bakterie beztlenowe (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*; *Bifidobacterium*) oraz w mniejszych liczbach, przedstawiciele bakterii tlenowych i względnie beztlenowych (*Enterobacteriaceae*; *Streptococcus*; *Staphylococcus*; *Lactobacillus*) (Hill M. J. and Drasar B. S., 1975). Do tej pory dzięki analizie sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano 395 gatunków bakterii tworzących jelitowy ekosystem z których zdecydowana większość nie daje się hodować (Ley R. E. et al., 2006; Eckburg P. B. et al., 2005).

Należy podkreślić, że flora jelitowa znajdująca się w treści jelitowej różni się składem ilościowym poszczególnych rodzajów i gatunków bakterii od flory zaadherowanej do błony śluzowej jelita i krypt jelitowych (Croucher S. C. et al., 1983; Eckburg P. B. et al., 2005). U zdrowego człowieka bakterie jelitowe nie kontaktują się bezpośrednio ze nabłonkiem ściany jelita, są bowiem oddzielone od niej przez warstwę śluzu. U dorosłych chorych na IBD liczba bakterii zaadherowanych do błony śluzowej jelita jest większa w porównaniu do osób zdrowych i zależność ta jest wprost proporcjonalna do ciężkości przebiegu choroby (Kleessen B. et al., 2002). Ponadto, w badaniach na modelach mysich IBD wykazano, że u zwierząt z zapaleniem jelit bakterie kontaktowały się

bezpośrednio z komórkami jelitowymi oraz że wzrastała liczba bakterii zarówno z rodzaju *Lactobacillus* jak i z rodziny *Enterobacteriaceae* - w grupie kontrolnej zwierząt, bakterie występowały wyłącznie na powierzchni śluzu (Strus M. et al., 2005). Warstwa śluzowa nie dopuszcza do bezpośredniego kontaktu komórek bakteryjnych z nabłonkiem. Jest oczywiste, że przekroczenie bariery śluzowej umożliwia kontakt nabłonka ze strukturami antygenowymi bakterii oraz powoduje zwiększone przenikanie antygenów bakterii do komórek jelitowych, co stymuluje układ immunologiczny do sekrecji czynników prozapalnych, a więc do zaostrzenia procesu chorobowego (Pullan R. D. et al., 1994).

W literaturze pojawiają się doniesienia na temat zwierząt u których na skutek zablokowania niektórych genów, np. IL-10 dochodzi do spontanicznego wystąpienia IBD. Jeśli takie zwierzęta są hodowane w warunkach germ-free, czyli pozbawione całkowicie flory jelitowej, to są one zupełnie nie podatne na zapalenie jelit, co jest kolejnym dowodem na istotną rolę flory jelitowej w patogenezie UC oraz CD (Onderdonk A. B., 2000). Ponadto, zaobserwowano, że u chorych leczonych sulfonamidami oraz antybiotykami obserwuje się zmniejszenie nasilenia objawów choroby. Może to pośrednio świadczyć o roli flory bakteryjnej w wywoływaniu i podtrzymywaniu stanu zapalnego.

Osobnym zagadnieniem jest wyjaśnienie, w jaki sposób komórki bakteryjne po przekroczeniu naturalnej bariery śluzu jelitowego wywołują wzmożoną odpowiedź systemu immunologicznego i w konsekwencji stan zapalny jelita. Wspomniano o produktach bakteryjnych takich jak LPS i peptydoglikan, które indukując produkcję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, wpływają na uwalnianie cytokin stymulujących odpowiedź zapalną.

Istnieją dowody wskazujące na to, że u ludzi dorosłych i zwierząt doświadczalnych z IBD, bakterie kontaktują się bezpośrednio z komórkami jelita i namnażają się w liczbach wyższych niż normalnie. W stanach zapalnych jelit opisano zjawisko nieszczelności bariery śluzówkowej, które jest przyczyną zwiększonego przenikania metabolitów bakteryjnych oraz ich produktów do błony śluzowej jelita, co w oczywisty sposób musi prowadzić do indukcji odpowiedzi zapalnej organizmu gospodarza (Hsueh W. et al., 1987; Sartor R. B. et al., 1985; McCall R. D. et al., 1994). Badania bakteryjnej flory jelitowej u osób chorych na IBD i u osób zdrowych wykazały, że bakterie kontaktują się u tych pierwszych

bezpośrednio z błoną śluzową w skutek zaniku bariery śluzu jelitowego (Swidsinski A. et al., 2005).

Należy podkreślić, że nie stwierdzono różnic jakościowych w składzie gatunkowym bakterii pomiędzy grupą osób zdrowych, a grupą osób z IBD, a jedynie różnice ilościowe, polegające na zwiększeniu populacji tlenowych bakterii Gram-ujemnych, najczęściej z gatunku *Escherichia coli* i zaniku populacji beztlenowych bakterii Gram-dodatnich, w tym bakterii kwasu mlekowego (*Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp.) (Croucher S. C. et al., 1983; Hartley C. L. et al., 1979).

Prawdopodobnie nie istnieje żaden konkretny czynnik mikrobiologiczny predysponujący do zachorowania na IBD, ale zmiany w składzie ilościowym flory bakteryjnej mogą wpływać u osób genetycznie predysponowanych na zmienioną odpowiedź GALT i odwrotnie. Prowadzi to do zaburzeń regulacyjnych w zakresie odporności wrodzonej i adaptacyjnej w odniesieniu do efektorowych oraz regulatorowych komórek T CD4+ (Elson C. O. et al., 2005).

Izolowane czynniki mikrobiologiczne jako przyczyna IBD.

Jak wspomniano, brak jest wiarygodnych danych świadczących o istnieniu jednego, bądź kilku konkretnych czynników patogennych, mogących mieć udział w patogenezie przewlekłych stanów zapalnych jelit. Mimo to, w literaturze fachowej pojawiają się doniesienia wskazujące na zainteresowanie badaczy poszukiwaniem takiego właśnie wytłumaczenia przyczyn IBD (Danese S. and Fiocchi C., 2006).

- *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Jednym z postulowanych czynników etiologicznych IBD jest *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Bakteria ta jest przyczyną choroby Johne`a (Johne`s disease) występującej u przeżuwaczy, która jest bardzo podobna do choroby Leśniowskiego – Crohna. W licznych badaniach podkreślono, że zawartość DNA i (lub) mRNA tej bakterii jest istotnie wyższa w tkance jelitowej zmienionej zapalnie u osób chorych na CD; nie potwierdzono natomiast tej prawidłowości u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (Hulten K. et al.,

2001; Autschbach F. et al., 2005). Niestety, uzyskane wyniki nie zostały potwierdzone przez innych autorów, ponadto próby kliniczne polegające na stosowaniu leczenia przeciwpłukowego osób z CD nie przyniosły zadowalających rezultatów (Thomas G. A. et al., 1998b).

- *Escherichia coli*.

Kolejną bakterią podejrzewaną o udział w patogenezie IBD jest *Escherichia coli*. Dotyczy to głównie szczepów adherujących do nabłonka jelitowego (ang. adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC), których obecność jest wiązana z CD w obrębie jelita cienkiego. Badania przeprowadzone na grupie pacjentów z CD wykazały że szczepy AIEC znaleziono u 36,4% pacjentów z CD i u 22,2% bez CD (Darfeuille-Michaud A. et al., 2004). Ponadto wcześniejsze wyniki przeprowadzonych testów sugerują wpływ hemolizyn produkowanych przez szczepy AIEC na degradację nabłonka jelitowego, co prowadzi do zaniku bariery śluzowej w jelicie i w konsekwencji do zmian zapalnych (Darfeuille-Michaud A. et al., 1998).

- *Paramyxovirus* – głównie wirus odry.

Oprócz bakterii, także wirusy odry są typowane jako ewentualny czynnik patogenny mogący mieć związek z patogenezą IBD. W śródbłonku naczyń krwionośnych w obrębie ziarniny u pacjentów z CD znaleziono cząstki wirusa w postaci fragmentów kapsydu wirionu i RNA. Rodzi to podejrzenia, że choroba Leśniowskiego – Crohna może być formą chronicznego zapalenia naczyń w śluzówce jelit, spowodowanego przewlekłą infekcją wirusem odry (Wakefield A. J. et al., 1995; Wakefield A. J. et al., 1993). Dane epidemiologiczne wskazują, że ekspozycja kobiet w ciąży na wirus odry może stanowić czynnik ryzyka zachorowania na CD u dzieci (Ekbohm A. et al., 1996).

- Inne czynniki mikrobiologiczne.

Oprócz wymienionych wyżej drobnoustrojów, w literaturze fachowej pojawiają się doniesienia o innych czynnikach mikrobiologicznych, mogących mieć związek z patogenezą IBD, są nimi: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cytomegalovirus* (Danese S. and Fiocchi C., 2006).

1.4.3.2 Wpływ innych czynników.

Po za opisanymi powyżej czynnikami genetycznymi, immunologicznymi oraz mikrobiologicznymi, istnieją także inne związane z zapadalnością na przewlekłe zapalenia jelit.

Do najbardziej nośnych, należy tzw. „hipoteza higieniczna”, w myśl której na skutek drastycznego wzrostu higienizacji warunków życia człowieka jego system immunologiczny nie reaguje prawidłowo na antygeny. Wysoki stopień higieny (wyjałowiony pokarm, poprawa higieny sanitarnej, zmniejszona ilość infekcji, mniej pasożytów, szerokie stosowanie antybiotyków) obserwowany jest w krajach wysoko rozwiniętych, co koreluje z większym w nich stopniem zapadalności na IBD oraz na inne choroby o podłożu autoimmunologicznym takie jak alergie (Bach J. F., 2002). Brak odpowiedniej ilości czynników mikrobiologicznych we wczesnym dzieciństwie, kiedy dojrzewa system immunologiczny, prowadzi do słabszej odpowiedzi odpornościowej w przyszłości lub do nadwrażliwości na antygeny stale występujące w środowisku życia człowieka (Borchers A. T. et al., 2005).

Kolejnym czynnikiem związanym z zachorowalnością na IBD jest palenie tytoniu. Nieco kontrowersyjnym jest fakt, że stwierdza się kompletnie przeciwny efekt wpływu palenia tytoniu na ryzyko zachorowania na CD i UC. O ile potwierdzono, że nałóg ten zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę Leśniowskiego – Crohna, a jej przebieg jest cięższy, to ryzyko zapadnięcia na wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest u palaczy trzykrotnie niższe niż u osób niepalących (Thomas G. A. et al., 1998a; Cottone M. et al., 1994).

Także zażywanie niektórych leków może mieć związek z ryzykiem zwiększonej zapadalności na IBD. Takie związki opisano w przypadku stosowania doustnej antykoncepcji u kobiet. Kobiety które stosowały doustną antykoncepcję wykazywały zwiększone ryzyko zapadalności na CD (Timmer A. et al., 1998). Natomiast długotrwałe stosowanie niesterydowych środków przeciwzapalnych zwiększało ryzyko skrócenia okresu remisji IBD u przedstawicieli obu płci (Kaufmann H. J. and Taubin H. L., 1987).

Jednym z czynników zwiększających ryzyko zapadnięcia na UC jest obecność wyrostka robaczkowego. U pacjentów poddanych apendektomii przed 20 rokiem życia obserwuje się zmniejszenie ryzyka zachorowania na UC nawet o 70 % w porównaniu do grupy kontrolnej (Danese S. et al., 2004).

Prawdopodobną przyczyną zmniejszenia zachorowalności po usunięciu wyrostka robaczkowego jest brak tkanki limfatycznej tego organu, która może stanowić rezerwar komórek immunologicznych związanych z tą jednostką chorobową.

1.5 Metody leczenia przewlekłych zapaleń jelit.

1.5.1 Dieta.

W leczeniu IBD bardzo ważnym elementem skutecznej terapii jest zastosowanie odpowiedniej diety. W schorzeniu tym bardzo często dochodzi do upośledzenia wchłaniania związków odżywczych z przewodu pokarmowego, zatem należy zwrócić uwagę na przestrzeganie odpowiednio zbilansowanej diety, pozwalającej na zaspokojenie potrzeb energetycznych organizmu i zapobiegającej utracie masy ciała, co jest szczególnie istotne w chorobie Leśniowskiego – Crohna. U ok. 30 % pacjentów cierpiących na IBD, stwierdza się nietolerancję laktozy, co dodatkowo komplikuje odżywianie (Hauser W. et al., 2007).

Nie istnieją specyficzne zalecenia co do sposobu żywienia chorych. Generalnie należy unikać pokarmów, których spożycie pacjent źle znosi oraz uzupełniać deficyty elektrolitów i witamin. W wypadku ciężkiego rzutu choroby stosuje się dietę bezresztkową, względnie żywienie dojelitowe lub parenteralne.

1.5.2 Leczenie farmakologiczne.

Ogólnie w farmakoterapii IBD stosuje się leki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym oraz immunosupresyjnym.

1.5.2.1 Leczenie przeciwzapalne.

U chorych z łagodną i umiarkowaną postacią IBD stosuje się kwas 5 – aminosalicylowy (5 – ASA) i sulfasalazynę (SASP). Leki te podaje się doustnie lub (i) doodbytniczo w postaci wlewek, pianek lub czopków. Pozytywna odpowiedź na leczenie występuje u ok. 40 – 80 % chorych (Śliwiński Z. K. and Stobiński M., 2006).

W przypadku pacjentów, którzy nie reagują na leczenie za pomocą 5 – ASA i SASP, stosuje się preparaty sterydowe, jak np. budesonid. W ciężkim rzucie choroby stosuje się hydrokortyzon lub prednizolon (Faubion W. A. et al., 2002). Kortykosteroidy zatrzymują kaskadę cytokin prozapalnych przez co wygaszają stan zapalny. Ponadto, leki z tej grupy hamują migrację komórek układu odpornościowego do miejsca zmienionego zapalnie w tkance, a także zmniejszają przepuszczalność naczyń kapilarnych.

Jako lek przeciwzapalny używany w terapii IBD, zastosowanie znalazł też talidomid. Lek ten hamuje syntezę cytokin prozapalnych: TNF α , IL-6 oraz IL-12. Pozytywne efekty uzyskano u 70 % chorych, u których zaobserwowano zamykanie się przetok okołodbytnicznych.

Obecnie w terapii IBD wprowadza się leczenie biologiczne, najczęściej w postaci przeciwciał anty - TNF α . Są to przeciwciała produkowane przez chimeryczne, ludzko – mysie limfocyty B. Preparat tych przeciwciał (influximab), często przynosi poprawę stanu klinicznego pacjenta, kiedy zawodzą inne metody leczenia farmakologicznego (Śliwiński Z. K. and Stobiński M., 2006).

1.5.2.2 Leczenie przeciwbakteryjne.

Jak wspomniano leczenie przeciwbakteryjne często przynosi ulgę pacjentom z IBD, co jest zapewne związane z działaniem tych leków na komensalną florę bakteryjną jelit (Sartor R. B., 1997). Prawdopodobnie mechanizm działania tych leków polega na zmniejszeniu liczebności populacji bakterii w jelicie, co prowadzi do spadku ilości antygenów oraz toksyn bakteryjnych indukujących odpowiedź immunologiczną ze strony GALT (Gionchetti P. et al., 2006a).

Doniesienia literaturowe nie potwierdzają skuteczności zastosowania antybiotyków u chorych na UC, natomiast dostępne są dane wskazujące na ich istotną rolę w leczeniu septycznych komplikacji CD (Gionchetti P. et al., 2006b; Gionchetti P. et al., 2006a). Antybiotykoterapię stosuje się w cięższym przebiegu choroby, zwłaszcza przy zagrożeniu perforacją ściany jelita lub kiedy pojawiają się przetoki.

Istnieją dowody, że użycie w terapii cyprofloksacyny i metronidazolu lub ich kombinacji przynosi wymierne efekty w postaci znacznego złagodzenia objawów choroby Leśniowskiego – Crohna (Arnold G. L. et al., 2002; Sutherland L. R. et al., 1991; Prantera C. et al., 1996).

1.5.2.3 Leczenie immunosupresyjne.

Wykorzystanie w terapii IBD substancji o działaniu hamującym system immunologiczny jest podyktowane koniecznością opanowania stanu zapalnego. Immunosupresja pozwala zmniejszyć pobudliwość systemu odpornościowego i tym samym nie dopuszcza do rozwinięcia stanu zapalnego, co w oczywisty sposób przyczynia się do złagodzenia objawów choroby, bądź do całkowitej ich eliminacji.

W terapii IBD stosowana jest azatiopryna (AZA). Substancja ta - podobnie jak jej metabolity - ma zdolność do indukowania apoptozy limfocytów T, co powoduje zmniejszenie odpowiedzi zapalnej (Neurath M. F., 2004). Stosowanie AZA w terapii pozwala na wyeliminowanie, bądź zmniejszenie konieczności stosowania sterydów (Dobrowolska-Zachwieja A., 2006).

Kolejnym lekiem jest mykofenolan mofetilu (MMF). Działa on cytotoksycznie na limfocyty B i T poprzez hamowanie syntezy nukleotydów guaninowych, co prowadzi do zmniejszenia odpowiedzi immunologicznej. MMF znajduje zastosowanie w okresach zaostrzenia CD (Śliwiński Z. K. and Stobiński M., 2006).

W ciężkich postaciach choroby używana bywa cyklosporyna (CY). - często jej zastosowanie pozwala na opóźnienie decyzji o podjęciu leczenia chirurgicznego (Winesett M., 1997). Dobre efekty terapeutyczne uzyskuje się u chorych z utrzymującymi się przetokami (Śliwiński Z. K. and Stobiński M., 2006).

1.5.3 Leczenie chirurgiczne.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego obejmuje całą okrężnicę, wobec tego jedynym sposobem leczenia jest pankolektomia. Po rozwiązaniu takie sięga się jedynie w najcięższych przypadkach, gdy leczenie farmakologiczne nie przynosi

efektów. Co prawda zabieg chirurgiczny prowadzi do wyleczenia z UC, jednak zachodzi konieczność wykonania zespolenia jelita cienkiego z odbytem z wytworzeniem tzw. sakwy (poucha), w której zbiera się treść jelitowa. U niektórych pacjentów należy wytworzyć sztuczny odbyt.

U pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna usuwa się jedynie zmienione odcinki jelita, zwykle dokonuje się usunięcia zastawki krętniczo – kątnicznej.

1.5.4 Zastosowanie probiotyków w IBD.

Teoria probiozy jest znana od ponad 100 lat. Już Iłja Miecznikow opisywał dobroczynny wpływ pałeczek kwasu mlekowego na stan zdrowia ludzi (Metchnikoff E., 1907). Obecnie terminem probiotyki, są określane żywe drobnoustroje, które wywierają prozdrowotny wpływ na organizm gospodarza (Araya M. et al., 2002). Najczęściej są to bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, niepatogenne paciorkowce *Streptococcus thermophilus* czy pałeczki *Escherichia coli*, a także grzyb *Saccharomyces boulardii*.

Probiotyki są powszechnie wykorzystywane jako suplementy diety lub składniki niezbędne w procesie wytwarzania produktów nabiałowych. Prowadzi się również badania naukowe, mające na celu wykorzystanie probiotycznych drobnoustrojów w leczeniu niektórych chorób o podłożu autoimmunologicznym czy zapalnym, jak alergii i przewlekłe zapalenia jelit (Cukrowska B. and Czarnowska E., 2007). W przypadku IBD podejmuje się próby leczenia przy użyciu jedynie probiotyków lub w terapii kombinowanej np. z antybiotykami czy z 5 – ASA.

Próby przeprowadzone na modelach zwierzęcych pokazały, że probiotyki są obiecującym środkiem poprawiającym stan zdrowia w sztucznie wywołanym stanie zapalnym jelit. Szczurom z chemicznie indukowanym stanem zapalnym jelit podawano preparat zawierający bakterie *Lactobacillus reuteri*, osiągając znaczne zmniejszenie się stanu zapalnego. U myszy ze znokautowanym genem kodującym IL-10, podawanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zapobiegało spontanicznemu rozwojowi stanu zapalnego przewodu pokarmowego (Madsen K. L. et al., 1999).

U ludzi z przewlekłymi zapaleniami jelit dobroczynny wpływ probiotyków został wykazany głównie u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz

z pouchitis, natomiast w przypadku choroby Leśniowskiego – Crohna ten efekt jest mniej znaczący (Mach T., 2006).

Postuluje się kilka podstawowych mechanizmów działania probiotyków w przewodzie pokarmowym, co wpływa na poprawę stanu zdrowia pacjentów z IBD. Jednym z ważniejszych jest ich oddziaływanie bakteriostatyczne na bakterie patogenne poprzez obniżenie pH w świetle przewodu pokarmowego lub sekrecję bakteriocyn, opisywane jest także blokowanie receptorów na powierzchni nabłonka, co ogranicza możliwość adherowania drobnoustrojów patogennych. Wykazano również, że bakterie probiotyczne mogą indukować sekrecję cytokin antyzapalnych jak IL-10, czy TGF β oraz hamować wytwarzanie TNF α . Ponadto, niektóre szczepy *Lactobacillus* mogą indukować zwiększenie się produkcji śluzu jelitowego, co dodatkowo zabezpiecza nabłonek jelitowy przed kontaktem z jelitową florą bakteryjną. Wszystko to może przyczyniać się do zmniejszenia się stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym w przebiegu przewlekłych stanów zapalnych jelit (Mach T., 2006; Gionchetti P. et al., 2006a).

2 CEL PRACY

Ogólnym celem niniejszej rozprawy była próba uzyskania odpowiedzi na pytania dotyczące ilościowego oraz jakościowego składu flory bakteryjnej jelita grubego dzieci chorych na przewlekłe zapalenia jelit. Szczegółowe cele badawcze wyszczególniono poniżej:

1. Jakościowa i ilościowa ocena składu bakteryjnej flory jelitowej u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do grupy kontrolnej.
 - Badanie flory bakteryjnej związanej ze śluzówką jelita w próbkach biopsyjnych.
 - Badanie całkowitej flory bakteryjnej kału.
 - Porównanie wyników ilościowego badania bakteryjnej flory jelitowej uzyskanych metodą klasycznego posiewu oraz przy zastosowaniu metody FISH (ang. Fluorescent in Situ Hybridization).
 - Porównanie jakościowego składu gatunkowego bakterii pomiędzy pacjentami z CD, UC i w grupie kontrolnej za pomocą metody DGGE (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

2. Ocena stanu warstwy śluzu jelitowego.
 - Porównanie grubości warstwy śluzowej pokrywającej ścianę światła jelita pacjentów na podstawie badania fluoromikroskopowego skrawków tkanki z biopłatów pobranych od pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.
 - Badanie wpływu bakteryjnej flory jelitowej na stopień degradacji mucyny in vitro.

3 MATERIAŁY

3.1 Charakterystyka pacjentów poddanych badaniu.

Przed rozpoczęciem badania protokół kliniczny uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego – opinia nr KBET/236/B/2002.

Badaniem objęto 61 dzieci w wieku od 1 do 18 roku życia, hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia CM UJ w Krakowie.

Przed włączeniem do badania pacjenci i/lub rodzice otrzymywali pisemną informację o celu i przebiegu badania jak również o dobrowolnym charakterze uczestnictwa.

KRYTERIA WŁĄCZENIA PACJENTÓW DO BADANIA:

- Krwista biegunka
- Obecność krwi utajonej w stolcu
- Przewlekła biegunka
- Bóle brzucha i/lub niedobór masy ciała
- Rozpoznanie histopatologiczne choroby Leśniowskiego - Crohna lub wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

KRYTERIA WYŁĄCZENIA Z BADANIA:

- dzieci poniżej 1 roku życia
- leczone antybiotykami w okresie 30 dni przed zachorowaniem
- z potwierdzonym infekcyjnym tłem zachorowania
- z potwierdzonymi zespołami nieprawidłowego wchłaniania i trawienia jelitowego
- z pierwotnymi enteropatiami wydzielniczymi
- karmione wyłącznie piersią
- z niedoborami odporności

- których rodzice lub opiekunowie nie wyrazili zgody na udział dziecka w badaniu

Zgodnie z przyjętymi wcześniej założeniami, dzieci włączone do badania podzielono na grupę badaną i grupę kontrolną.

- **Grupa badana**

Grupę badaną (n=34) stanowili chorzy na IBD, u których rozpoznanie postawiono na podstawie objawów klinicznych oraz wyników badań immunologicznych, endoskopowych i histopatologicznych. Do tej grupy zostali przydzieleni chorzy z nowo rozpoznany (pierwszorazowy) zachorowaniem na IBD oraz dzieci, u których wystąpiło zaostrzenie rozpoznanej wcześniej choroby. Na podstawie rozpoznania chorych podzielono na dwie grupy:

1. Choroba Leśniowskiego – Crohna (CD)
2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC)

- **Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną (n=27) stanowili pacjenci z czynnościowymi zaburzeniami przewodu pokarmowego, u których wykluczono IBD.

Charakterystykę badanych grup pacjentów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka badanych grup pacjentów

| | CD n = 22 | UC n = 12 | Grupa kontrolna n = 27 |
|--|----------------------------|----------------------------|---|
| Chłopcy : dziewczynki (%) | 10 : 12 (45 : 55%) | 5 : 7 (42 : 58%) | 10 : 17 (37 : 63%) |
| Wiek (±SD) | 16,22 (± 3,8) | 14,74 (± 2,9) | 14,13 (± 4,4) |

3.2 Charakterystyka badanych próbek.

Badanymi próbkami były biopłaty uzyskane ze śluzówki jelita grubego, pobrane w czasie kolonoskopii dzieci z IBD. Próbki pobierano z miejsca zmienionego zapalnie oraz miejsca makroskopowo prawidłowego, zaś w przypadku pacjentów z grupy kontrolnej, tylko z miejsca makroskopowo prawidłowego (niezmienionego zapalnie).

Próbki były dostarczane do Katedry Mikrobiologii CM UJ w płynnym podłożu Schaedlera (Oxoid) z dodatkiem glicerolu, w stanie głębokiego zmrożenia (-80°C).

Dodatkowo, dostarczane były także skrawki tych samych tkanek (ciętych na kriostacie) w celu wykonania analizy fluoromikroskopowej z użyciem lektyny specyficznej dla polisacharydów budujących ludzki śluz jelitowy. Skrawki te były umieszczone na szkiełkach podstawowych SuperFrost®Plus i transportowane do Katedry w warunkach chłodniczych (-20°C).

Oprócz próbek tkanki, badaniom poddane zostały także próbki kału pochodzące od tych samych pacjentów, od których pobrano próbki tkanki. Kał został pobrany w trzech frakcjach w trakcie przygotowywania pacjentów do zabiegu kolonoskopii i był transportowany do laboratorium w jałowych woreczkach foliowych, w stanie zamrożenia (-20°C):

- I. frakcja – kał uzyskany w wyniku płukania jelita grubego roztworem soli fizjologicznej
- II. frakcja – kał uzyskany po doustnym podaniu preparatu Phospho-Laxative.
- III. frakcja – kał uzyskany po kolejnym płukaniu jelita grubego roztworem soli fizjologicznej

Badanie treści jelitowej z każdej frakcji miało na celu stwierdzenie, czy skład jakościowy flory jelitowej obecnej w tak uzyskanych próbkach jest zbliżony do składu flory przywartej do śluzówki obecnej w biopłatach i czy zmienia się w miarę kolejnego płukania, a zatem usuwania flory planktonowej.

4 METODY

4.1 *Klasyczne metody oparte na hodowli bakterii.*

4.1.1 Ilościowy posiew bakteriologiczny próbek tkanki jelitowej oraz próbek kału.

1. Próbkę tkanki dokładnie ważono na wadze analitycznej (Radwag),, a następnie umieszczano ją w 1 ml płynnego podłoża Schaedlera (Oxoid) i poddawano procesowi homogenizacji w szklanym moździerzu.
Próbkę kału wstępnie homogenizowano w dezintegratorze Stomacher (Interscience) przez 3 minuty, następnie odwirowywano – 3000 rpm / 10 min w wirówce (Jouan), w celu odseparowania frakcji płynnej, zawierającej sól fizjologiczną, użytą do płukania okrężnicy przed badaniem kolonoskopowym.
2. Uzyskany osad masy kałowej, dokładnie ważono na wadze analitycznej i zawieszano w płynnym podłożu Schaedlera, tak aby uzyskać ostatecznie 1ml objętości próbki.
3. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 4 – 5 jałowych, szklanych kulek ϕ 5 mm. Całość intensywnie wytrząsano przez 3 min na mieszadle laboratoryjnym.
4. Zarówno homogenat tkanki, jak i kału badano za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń w płynnym podłożu Schaedlera. Sporządzono pięć kolejnych dziesiętnych rozcieńczenia wyjściowej próbki Ostatecznie wysiewano po 100 μ l rozcieńczonej zawiesiny na szalki Petriego, zawierające różnicujące podłoża agarowe (wymienione poniżej).
5. Hodowlę prowadzono inkubując szalki przez 24h w warunkach tlenowych w 37 °C oraz w warunkach beztlenowych w komorze MACS - Don Whitley przez 48h, również w 37 °C.

6. Wyrosłe kolonie bakteryjne wstępnie klasyfikowano na podstawie ich morfologii i zliczano. Następnie prowadzono bardziej szczegółową diagnostykę mikrobiologiczną przy użyciu metody barwienia Grama oraz testów systemu API (bioMérieux) w celu określenia przynależności rodzajowej oraz gatunkowej wyhodowanych bakterii.
7. Wyniki analizowano za pomocą programu komputerowego API LAB przeznaczonego do klasyfikacji badanych bakterii.
8. Uzyskany wynik ilościowej zawartości poszczególnych typów bakterii w odważonej masie próbki, przeliczano na masę 1 grama tkanki lub kału w celu dokonania porównania liczby bakterii pomiędzy poszczególnymi próbkami.

PODŁOŻA:

- Blood Agar (Oxoid) - tlenowo - wszystkie bakterie aerofilne
- McConkey Agar (Oxoid) - tlenowo - *Enterobacteriaceae*
- Bile Esculin Azid Agar (Biocorp) - tlenowo - *Enterococcus*
- MRS Agar (Oxoid) - beztlenowo - *Lactobacillus*
- Wilkins Chalgren-supl Agar (Oxoid) - beztlenowo - *Bacteroides*,
Fusobacterium i *Eubacterium*
- Schaedler Agar (Oxoid) - beztlenowo - wszystkie bakterie anaerofilne
- Agar BL (Clark P. A. et al., 1993) - beztlenowo - *Bifidobacterium*
- Schaedler Broth (Oxoid) - do metody seryjnych rozcieńczeń

4.1.2 Badanie degradacji mucyny przez florę kałową oraz przywartą do śluzówki jelita metodą płytkową (Zhou J.S. et al., 2001).

1. Próbkę kału zagęszczano w wirówce – 3000 rpm / 10 min, w celu usunięcia soli fizjologicznej użytej do płukania okrężnicy przed badaniem kolonoskopowym.

2. Osad zawieszano w 4,5 ml PBSu i dodawano 4 – 5 jałowych, szklanych kulek ϕ 5 mm i całość intensywnie wytrząsano przez 3 min na mieszadle laboratoryjnym.
3. Probówkę z homogenatem poddawano wirowaniu – 1500 rpm / 1 min.
4. 100 μ l nadsącza zawierającego bakterie z flory kałowej posiewano do 1 ml płynnego podłoża Shaedlera (w przypadku tkanki posiewano 100 μ l homogenatu z mózdzieża).
5. Hodowlę prowadzono inkubując próbki w warunkach beztlenowych w komorze MACS - Don Whitley przez 24 godziny, w 37 °C.
6. Na powierzchnię płytek Petriego z podłożem B наносzono 20 μ l zawiesiny badanych próbek. Jako kontrolę negatywną użyto hodowli zabitej w autoklawie.
7. Płytki z naniesionymi na powierzchnię próbkami inkubowano w warunkach beztlenowych w 37°C przez 72 godziny.
8. Płytki wybarwiano 0,1% roztworem czerni amidowej w 3,5M kwasie octowym przez 30 minut.
9. Płytki odpłukiwano 1,2M roztworem kwasu octowego do momentu zaobserwowania strefy degradacji mucyny (odbarwione halo wokół kolonii).
10. Stopień degradacji mucyny był określany poprzez pomiar średnicy strefy halo.

PODŁOŻA I ODCZYNNIKI:

- Podłoże B (pH = 7,2):

| | |
|---|----------|
| trypton (Oxoid) | 7,5 g/l |
| casitone (Difco) | 7,5g/l |
| wyciąg drożdżowy (Oxoid) | 3,0g/l |
| wyciąg mięsny (Merck) | 5,0g/l |
| NaCl | 5,0g/l |
| K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O | 3,0g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5g/l |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,5g/l |
| cysteina HCl (Sigma) | 0,5g/l |
| resazuryna (BDH) | 0,002g/l |

| | |
|----------------------------|--------|
| oczyszczona mucyna (Sigma) | 5g/l |
| agarozą (Sigma) | 1,5g/l |

- Schaedler Broth (Oxoid)
- czerni amidowa (Sigma)
- kwas octowy (POCh)

4.2 Metody biologii molekularnej.

4.2.1 Ilościowe badanie bakteriologiczne przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydacji in situ – FISH.

FISH jest metodą polegającą na zastosowaniu krótkich, oligonukleotydowych sekwencji jednoniciowego DNA (tzw. sond), znakowanych znacznikiem fluorescencyjnym. Sondy wykazują powinowactwo do sekwencji 16S rRNA podjednostki rybosomalnej *Prokaryota* i są specyficzne dla konkretnych taksonów bakterii. Umożliwia to detekcję konkretnych typów taksonomicznych drobnoustrojów na podstawie świecenia ich komórek w preparacie mikroskopowym. Odpowiednia standaryzacja metody, pozwala na ocenę liczby bakterii w badanej próbce na podstawie zliczenia świecących komórek bakteryjnych w preparacie mikroskopowym.

4.2.1.1 Badanie próbek tkanki jelitowej.

1. Próbkę tkanki dokładnie ważono na wadze analitycznej, a następnie umieszczano w 1 ml jałowej soli fizjologicznej.
2. Próbkę poddawano homogenizacji w jałowym, szklanym moździerzu.
3. Uzyskany homogenat mieszano w stosunku 1 ÷ 3 z 4% roztworem paraformaldehydu w celu utrwalenia.
4. Utrwalanie próbki prowadzono przez 15 min w temperaturze 4 °C.
5. Na mikroskopowe szkiełko podstawowe SuperFrost®Plus (MENZEL-GLASER) nakładano 10 µl utrwalonej zawiesiny na powierzchnię 1 cm².

6. Po wysuszeniu preparatu, szkiełko płukano w buforze PBS, a następnie na 20 min zalewano 96 % metanolem (POCH) i inkubowano w temperaturze – 20 °C.
7. Po odpłukaniu metanolu, preparat trawiono lizozymem - 1mg/ml (Sigma) przez 10 min w 37 °C.
8. Lizozym odpłukiwano ddH₂O i nakładano mieszankę sondy (po 5 ng każdej) EUB oraz innej, specyficznej gatunkowo sondy w buforze do hybrydyzacji.
9. Proces hybrydyzacji powadzono przez 3 godziny, w 50 °C, w wilgotnej komorze.
10. Po odpłukaniu niezhybrydyzowanych sond przy użyciu buforu TRIS, preparat inkubowano przez 1,5 min w temperaturze pokojowej z barwnikiem DAPI (Sigma), w celu dobarwienia kwasów nukleinowych obecnych w próbce.
11. DAPI odpłukiwano jałową ddH₂O.
12. Preparaty suszono w ciemności i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym BX51 (Olympus) – obiektyw immersyjny 100x.

Zastosowano także alternatywną metodę polegającą na przeprowadzeniu procesu hybrydyzacji in situ na histologicznych skrawkach tkanek umieszczonych na szkiełku podstawowym SuperFrost®Plus. Próbki utrwalano paraformaldehydem jak wyżej, a następnie kontynuowano procedurę przedstawioną w p. 4.2.1.1 poczynając od punktu 6.

4.2.1.2 Badanie próbek kału.

1. Próbkę kału wstępnie homogenizowano w urządzeniu homogenizującym Stomacher (Interscience) przez 3 minuty.
2. Na jałowo, odcinając koniuszek worka, przelewano zawartość masy kałowej do jałowych probówek typu Falcon 15 (Greiner).
3. Próbkę zagęszczano w wirówce – 3000 rpm / 10 min w celu usunięcia soli fizjologicznej użytej do płukania okrężnicy przed badaniem kolonoskopowym.

4. Odrzucano nadsącz, zaś osad dokładnie ważono.
5. Do FISH używano ok. 0,5 g masy kałowej, którą zawieszano w 4,5 ml jałowego buforu PBS.
6. Do zawiesiny dodawano 4 – 5 jałowych, szklanych kulek ϕ 5 mm i całość intensywnie wytrząsano przez 3 min na mieszadle laboratoryjnym.
7. Probówkę z homogenatem poddawano wirowaniu – 1500 rpm / 1 min.
8. Nadsącz zawierający bakterie mieszano w stosunku 1 ÷ 3 z 4% roztworem paraformaldehydu w celu utrwalenia (tj. 300 μ l supernatantu do 900 μ l paraformaldehydu).
9. Utrwalanie próbki przeprowadzono przez 15 min w temperaturze 4 °C.
10. Na mikroskopowe szkiełko podstawowe SuperFrost®Plus (MENZEL-GLASER) nakładano 10 μ l utrwalonej zawiesiny na powierzchnię 1 cm².
13. Po wysuszeniu preparatu, szkiełko płukano w buforze PBS, a następnie na 20 min zalewano 96 % metanolem i inkubowano w temperaturze – 20 °C.
14. Po odpłukaniu metanolu, preparat trawiono lizozymem - 1mg/ml przez 10 min w 37 °C.
15. Lizozym opłukiwano ddH₂O i nakładano mieszanę sond (po 5 ng każdej) EUB oraz innej, specyficznej gatunkowo sondy FISH w buforze do hybrydyzacji.
16. Proces hybrydyzacji powadzono przez 3 h, w 50 °C, w wilgotnej komorze.
17. Po odpłukaniu niezhybrydyzowanych sond przy użyciu buforu TRIS, preparat inkubowano przez 1,5 min w temperaturze pokojowej z barwnikiem DAPI, w celu dobarwienia kwasów nukleinowych obecnych w próbce.
18. DAPI odpłukiwano jałową ddH₂O.
19. Preparaty suszono w ciemności i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym BX51 (Olympus) – obiektyw immersyjny 100x.

W celu obliczenia zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej stosowano następującą formułę matematyczną, w której przyjęto założenie, że 0,5 g odwirowanej masy kałowej, odpowiada objętość 0,5 ml:

$$L_B = \frac{b * 17217 * z * \frac{4500 + m_k}{300}}{M_k} [cfu / g]$$

- L_B – liczba bakterii w 1 g masy kałowej
- b – średnia liczba bakterii zliczona w trzech polach widzenia mikroskopu
- z – współczynnik zagęszczenia próbki (np. 12, lub 120)
- m_k - masa kału w [mg]
- M_k - masa kału w [g]
- cfu – jednostki tworzące kolonie

Stosowano następujące sondy (Eurogentec):

- **EUB338** – wszystkie bakterie;
(Jansen G. J. et al., 2000)
5` - GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3`
- **STREP** – rodzaj *Streptococcus*;
(Jansen G. J. et al., 2000)
5 - GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA - 3`
- **Lab158** – rodzaj *Lactobacillus* i *Enterococcus*;
(Harmsen H. J. M. et al., 2000)
5` - GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA - 3`
- **Bif164** – rodzaj *Bifidobacterium*;
(Langendijk P. S. et al., 1995)
5` - CAT CCG GCA TTA CCA CCC - 3`
- **BAC303** – rodzaj *Bacteroides*;
(Manz W. et al., 1996)
5` - CCA ATG TGG GGG ACC TT - 3`
- **ECOLI** – gatunek *E. coli*;
(Jansen G. J. et al., 2000)
5` - GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC CC - 3`
- **Erec482** – gatunek *Clostridium coccooides*;
(Franks A. H. et al., 1998)
5` - GCT TCT TAG TCA RGT ACC G - 3`
- **DAPI (Sigma)**

znakowana na 5` i 3` końcu
fluoresceiną
(zielona fluorescencja)

znakowane na 5` końcu
CY3
(czerwona fluorescencja)

BUFORY DO HYBRYDYZACJI:

- Bufor do hybrydyzacji (20 mM Tris HCl; 0,9 M NaCl; 0,1% SDS; pH=7,2) (Sigma)
- Bufor TRIS (20 mM Tris HCl; 0,9 M NaCl; pH=7,2) (Sigma)
- Bufor PBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄ 2H₂O; 0,24g KH₂PO₄; pH=7,4) (POCh)
- 4 % paraformaldehyd (2g paraformaldehydu; 100µl 1M NaOH; 100µl 1M HCl; 16,6 ml. 3xPBS (Sigma, POCh)

4.2.2 Pomiar grubości warstwy śluzowej wytwarzanej przez śluzówkę jelita badanych pacjentów.

Uzyskane skrawki tkanki pobranej od pacjentów włączonych do badania były poddane działaniu lektyny MAA (EY Laboratories Inc.) znakowanej fluorescencyjnie za pomocą fluoresceiny (FITC). Lektyna wiązała się specyficznie do polisacharydów śluzu jelitowego, dzięki temu możliwe było zobrazowanie warstwy śluzu oraz pomiar jej grubości przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego (Freitas M. et al., 2002).

1. Skrawki tkanki jelita na szkiełku podstawowym SuperFrost®Plus rozmrażano w temperaturze pokojowej.
2. Przygotowywano roztwór lektyny MAA (20 µg/ml) w buforze PBS z azydkiem sodu.
3. Na szkiełko podstawowe nakładano 50 µl roztworu lektyny MAA i przykrywano całość szkiełkiem nakrywkowym.
4. Preparaty inkubowano w ciemności, w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej przez 0,5 h.
5. Odplukiwano dokładnie niezwiązaną lektynę buforem PBS z azydkiem sodu.
6. Preparat inkubowano przez 1,5 min w temperaturze pokojowej z barwnikiem DAPI, w celu dobarwienia kwasów nukleinowych obecnych w próbce.
7. DAPI odplukiwano jałową ddH₂O.

8. Preparaty suszono w ciemności i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym BX51 (Olympus) – obiektyw 10x.

BUFOR DO BARWIENIA LEKTYNA:

- Bufor PBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄ 2H₂O; 0,24g KH₂PO₄; pH=7,4; 0,05% azydek sodu) (POCh)

4.2.3 Porównanie składu gatunkowego bakterii jelitowych w próbkach pochodzących od pacjentów z CD, UC i z grupy kontrolnej, przy użyciu metody DGGE.**4.2.3.1 Izolacja DNA.**

DNA bakteryjne izolowano bezpośrednio z próbek kału, jak i z płynnego podłoża Schaedlera, w którym hodowano przez noc w warunkach beztlenowych próbki homogenatów tkanek pobranych w trakcie badania kolonoskopowego.

1. Próbkę kału zagęszczano w wirówce – 3000 rpm / 10 min, w celu usunięcia soli fizjologicznej użytej do płukania okrężnicy przed badaniem kolonoskopowym.
2. Osad zawieszano w 4,5 ml PBSu i dodawano 4 – 5 jałowych, szklanych kulek ϕ 5 mm i całość intensywnie wytrząsano przez 3 min na mieszadle laboratoryjnym.
3. Probówkę z homogenatem poddawano wirowaniu – 1500 rpm / 1 min.
4. 1ml uzyskanego nadsącza wirowano – 3000 rpm / 10 min.
5. Osad rozprowadzano w 1 ml buforu PBS i ponownie wirowano jak poprzednio.
6. Osad rozprowadzano w 1 ml buforu PBS i wirowano – 10 000 rpm / 5 min.
7. Z oczyszczonego osadu izolowano DNA bakteryjne przy użyciu zestawu do izolacji DNA według protokołu dostarczonego przez producenta. W przypadku próbek tkanki, do izolacji DNA używano 1 ml uzyskanej

hodowli, którą poddawano wirowaniu jak w p. 6, a następnie izolowano DNA zgodnie z zaleceniami producenta zestawu do izolacji DNA.

PODŁOŻA I ODCZYNNIKI:

- Zestaw do izolacji DNA Genomic Mini (DNA Gdańsk)
- Lizozym (10 mg / ml) (Sigma)
- Schaedler Broth (Oxoid)
- Bufor PBS

4.2.3.2 Amplifikacja PCR materiału genetycznego bakterii.

- 1 Mieszaninę PCR przygotowywano na lodzie, w celu uniknięcia otrzymania niespecyficznych produktów amplifikacji DNA.
- 2 Objętość mieszaniny przewidziana na 1 próbkę wynosiła 25 μ l.
- 3 Przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczano w termocyklerze PTC-200 (BioRad), uprzednio podgrzanym do temperatury 95°C.
- 4 Amplifikację prowadzono zgodnie z programem (Walter J. et al., 2000):

| | [μ l] | Program amplifikacji: | |
|---------------------|------------|-----------------------|-------|
| • Woda | 9,75 | 1. 94°C - 4min | } 40x |
| • Bufor | 2,5 | 2. 94°C - 30sek | |
| • dNTP | 2,5 | 3. 56°C - 30sek | |
| • HDA1 | 2,5 | 4. 72°C - 1min | |
| • HDA2 | 2,5 | 5. 72°C - 7min | |
| • MgCl ₂ | 1,0 | | |
| • polimeraza | 0,25 | | |
| • DNA | 4 | | |

5. Po zakończonej reakcji amplifikacji nakładano próbki w objętości 5 μ l na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydy, w celu stwierdzenia obecności produktu reakcji PCR (200 pz). Elektroforezę prowadzono w 0,5 x buforze TBE, przez 1,5 h, pod napięciem 80 V. Wynik elektroforezy

oglądano przy użyciu systemu GelDoc2000 (BioRad) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu Quantity One (BioRad).

BUFORY I ODCZYNNIKI:

W reakcji PCR wykorzystano startery HDA1 oraz HDA2, zaprojektowane tak, aby obejmowały obszar V2 – V3 16S rDNA bakteryjnego (Walter J. et al., 2000).

- HDA1 5` - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3` (1µM) (DNA Gdańsk)
- HDA2 5` - GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3` (1µM) (DNA Gdańsk)
- Dejonizowana, bidestylowana, jałowa woda (Millipore)
- Bufor reakcyjny do polimerazy 10x (DNA Gdańsk II)
- Mieszanina czterech deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 µM każdy (Roche)
- Chlorek magnezu (20 mM) (DNA Gdańsk)
- Polimeraza *Pwo* Delta 3 (2U / µl) (DNA Gdańsk)
- Agaroz (BioRad)
- Bromek etydy (10mg/ml) (BioRad)
- Bufor TBE 10x (BioRad)
- Bufor obciążający (błękit bromofenolowy 0,25g/ml, glicerol 20%) (Sigma)
- Marker wielkości 100-1000pz (DNA Gdańsk)

4.2.3.3 Elektroforeza DGGE.

1. Przygotowywano dwa roztwory po 25 ml 8% akrylamidu – bisakrylamidu, zawierające odpowiednio 70% (A) i 35% (B) mieszaniny denaturantów podwójnej helisy DNA (mocznik i formamid).

A: **17,5 ml** (100%) + **7,5 ml** (0%)

B: **8,75 ml** (100%) + **16,25 ml** (0%)

2. Do roztworów A i B dodano katalizatorów reakcji polimeryzacji: po 125 μ l 20% roztworu APS i 12,5 μ l TEMED.
3. Do wcześniej schłodzonego w temperaturze -20°C miksera gradientu (Ingeny), wlewano roztwór A do kolumny A i roztwór B do kolumny B.
4. Przepływ mieszanki obu roztworów do kasety stanowiącej matrycę żelu (Ingeny) i zawierającej grzebień elektroforetyczny oraz specjalną folię usztywniającą żel, wymuszano za pomocą pompy perystaltycznej (Sigma).
5. Żel pozostawiano do polimeryzacji na okres co najmniej 1 godziny w temperaturze pokojowej.
6. W czasie polimeryzowania żelu, przygotowywano 17 litrów 0,5 x stężonego buforu TAE, który wlewano do komory elektroforetycznej aparatu do elektroforezy DGGE *INGENY* phorU (Ingeny).
7. Bufor w aparacie podgrzewano do temperatury 60°C .
8. Po spolimeryzowaniu żelu, kasetę umieszczano w komorze elektroforetycznej i ostrożnie usuwano grzebień, aby uwolnić studzienki.
9. Do studzienek nakładano po 20 μ l próbek uzyskanych po reakcji PCR, wymieszanych z 10 μ l buforu obciążającego.
10. Elektroforezę prowadzono przez 16,5 godziny, pod napięciem 110 V i przy natężeniu prądu ok. 55 mA, w temperaturze 60°C .
11. Żel barwiono roztworem bromku etydyny.
12. Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDoc2000 (BioRad) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu Quantity One (BioRad).
13. Obraz uzyskanych prążków analizowano i sporządzano dendrogramy przy użyciu programu GelCompare II (Applied Maths).

BUFORY I ODCZYNNIKI:

- 40% roztwór akrylamid / bis – akrylamid 37,5:1 (Sigma)
 - 100 % roztwór mieszaniny denaturantów podwójnej helisy DNA: 7M mocznik (Sigma); 40 % formamid (Fluka); 8% roztwór akrylamid / bis – akrylamid; 0,5x TAE, woda
 - 0 % roztwór mieszaniny denaturantów podwójnej helisy DNA: roztwór akrylamid / bis – akrylamid; 0,5x TAE, woda

- APS (nadsiaroczan amonu) 20 % (Sigma)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma)
- Bromek etydyny (10mg/ml) (BioRad)
- Bufor TAE 50x (BioRad)
- Bufor obciążający (błękit bromofenolowy 0,25g/ml, glicerol 20%) (Sigma)
- Dejonizowana, bidestylowana, jałowa woda (Millipore)
- Folia usztywniająca żel: GelBond PAG Film (Lonza)

4.3 Cyfrowe metody uzyskiwania wyników i metody statystyczne.

Uzyskanie wyników wielu badań było możliwe jedynie przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania komputerowego. Listę wykorzystanego oprogramowania zamieszczono poniżej.

W przypadku analiz statystycznych posłużono się testem frekwencji χ^2 , za pomocą którego przedstawiono związki pomiędzy poszczególnymi grupami taksonomicznymi bakterii, a grupami reprezentującymi poszczególne typy IBD, tj. CD, UC oraz grupą kontrolną. Ponadto, wykorzystano także testy: t – Studenta, mediany i U Manna-Whitneya. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

- **QuantityOne v.4.0.3 (BioRad)**
program umożliwił uzyskanie obrazu oraz analizę wyników elektroforezy na żelach agarozowych i poliakrylamidowych
- **API LAB Plus v.3.3.3 (bioMerieux)**
program umożliwił odczyt wyniku z pasków testu API
- **AnalySis (Soft Imaging)**
program umożliwił kontrolę nad mikroskopem fluorescencyjnym BX51, a także pozwolił na zliczanie komórek bakteryjnych w polu widzenia oraz na pomiar grubości warstwy śluzu jelitowego
- **GelCompar II (Applied Maths)**
program umożliwił porównanie składu gatunkowego bakteryjnej flory jelitowej na podstawie analizy żeli uzyskanych z elektroforezy DGGE.

- **Corel® DRAW™ v. 11.704 (Corel Corporation)**
program umożliwił obróbkę graficzną rycin i wykresów stanowiących dokumentację badawczą
- **Adobe®Photoshop® v. 7.0 (Adobe Systems Incorporated)**
program umożliwił obróbkę graficzną fotografii stanowiących dokumentację badawczą
- **Microsoft® Excel 2000 v. 9.0.2812 (Microsoft Corporation)**
program umożliwił wstępną obróbkę uzyskanych danych liczbowych oraz tworzenie wykresów
- **Microsoft® Word 2000 v. 9.0.2812 (Microsoft Corporation)**
program umożliwił napisanie tekstu niniejszej pracy doktorskiej
- **Statistica PI v.6.0 (StatSoft)**
program umożliwił statystyczne opracowanie wyników przeprowadzonych badań

5 WYNIKI

5.1 Ogólna liczba przebadanych próbek.

Poniżej, w tabelach 2 - 4 przedstawiono szczegółowo liczby przebadanych próbek w poszczególnych grupach z zastosowaniem następujących metod: ilościowego posiewu mikrobiologicznego, fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), elektroforezy DNA w gradiencie denaturującym (DGGE), fluorescencyjnego pomiaru grubości warstwy śluzu in situ w skrawkach tkanki jelita oraz degradacji mucyny in vitro.

Tabela 2 Zestawienie liczby przebadanych próbek w grupie kontrolnej

| Grupa kontrolna (n = 27) | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------|------------------|--------|----------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|--------|---------|---------|
| METODA POSIEWU | | | | FISH | | | DGGE | | | | ŚLUZ | |
| I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | grubość | rozkład |
| 19 | 13 | 13 | 27 | 14 | 12 | 10 | 5 | 8 | 7 | 5 | 8 | 7 |
| w sumie 148 oznaczeń | | | | | | | | | | | | |

Tabela 3 Zestawienie liczby przebadanych próbek w badanej grupie pacjentów z CD

| Pacjenci z chorobą Leśniowskiego i Crohna (n=22) | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------------------|--------|----------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|--------|---------|---------|
| METODA POSIEWU | | | | FISH | | | DGGE | | | | ŚLUZ | |
| I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | grubość | rozkład |
| 6 | 6 | 14 | 27 | 4 | 6 | 15 | 2 | 3 | 10 | 10 | 13 | 10 |
| w sumie 126 oznaczeń | | | | | | | | | | | | |

Tabela 4 Zestawienie liczby przebadanych próbek w badanej grupie pacjentów z UC

| Pacjenci z wrzodziejącym zapalenie jelita grubego (n=12) | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------------------|--------|----------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|--------|---------|---------|
| METODA POSIEWU | | | | FISH | | | DGGE | | | | ŚLUZ | |
| I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | I frakcja kału | II frakcja kału | III frakcja kału | tkanka | grubość | rozkład |
| 3 | 3 | 7 | 15 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 5 | 10 | 7 | 9 |
| w sumie 71 oznaczeń | | | | | | | | | | | | |

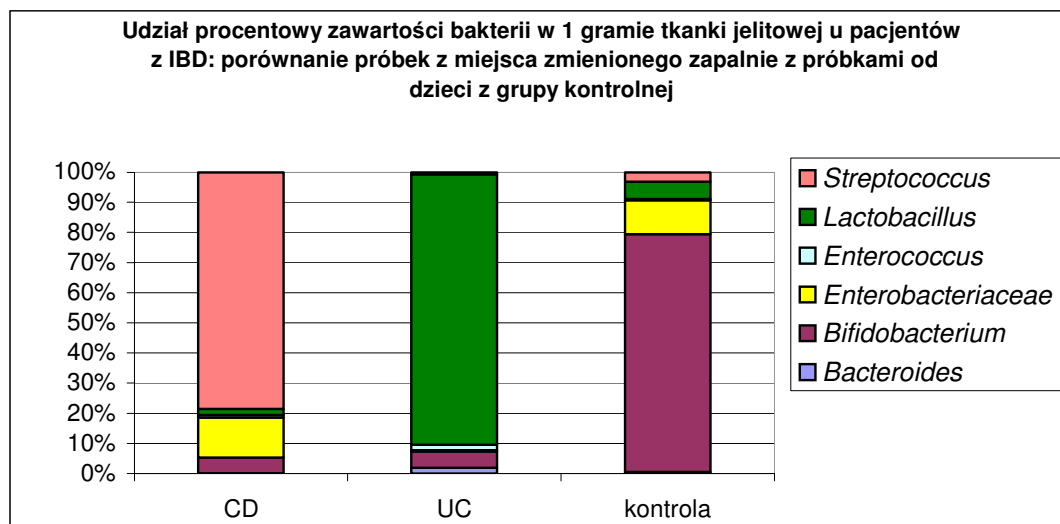
5.2 Jakościowa i ilościowa ocena składu bakteryjnej flory jelitowej u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

5.2.1 Udział procentowy zawartości bakterii w poszczególnych typach badanych próbek.

5.2.1.1 Tkanka jelitowa.

Ilościowy posiew bakteriologiczny próbek tkanki jelitowej.

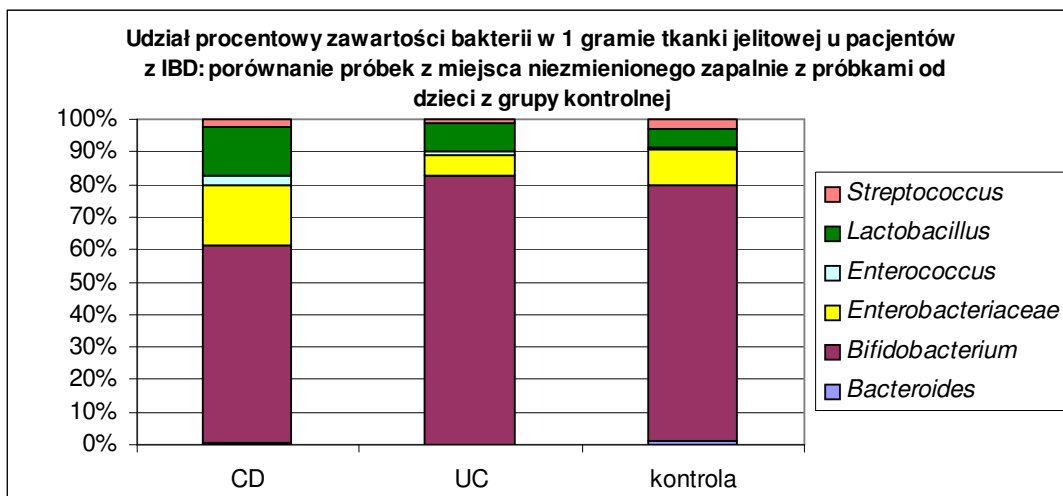
Zbiorcze wyniki posiewu bakteriologicznego tkanek pobranych od badanych pacjentów przedstawiono w stosunku procentowym na poniższych rycinach. Dodatkowo załączono tabele korespondujące z wykresami, w których przedstawiono bezwzględne liczby bakterii.



Rycina 2 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej. $\chi^2=62600000$, $p < 0,0001$

Tabela 5 Porównanie liczby bakterii zawartych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej.

| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|--|--|--|--|--|--|
| CD | $1,24 \times 10^5$ $\pm 1,37 \times 10^5$ | $8,62 \times 10^6$ $\pm 1,01 \times 10^6$ | $2,17 \times 10^7$ $\pm 3,06 \times 10^6$ | $1,36 \times 10^6$ $\pm 2,03 \times 10^4$ | $3,37 \times 10^6$ $\pm 5,36 \times 10^6$ | $1,29 \times 10^8$ $\pm 2,33 \times 10^6$ |
| UC | $2,00 \times 10^6$ $\pm 2,13 \times 10^5$ | $5,56 \times 10^6$ $\pm 2,01 \times 10^6$ | $4,92 \times 10^5$ $\pm 9,33 \times 10^5$ | $1,80 \times 10^6$ $\pm 1,54 \times 10^6$ | $9,28 \times 10^7$ $\pm 2,35 \times 10^6$ | $6,83 \times 10^5$ $\pm 1,95 \times 10^6$ |
| kontrola | $1,63 \times 10^6$ $\pm 9,48 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^8$ $\pm 4,15 \times 10^5$ | $1,94 \times 10^7$ $\pm 4,15 \times 10^5$ | $6,82 \times 10^5$ $\pm 1,46 \times 10^5$ | $1,01 \times 10^7$ $\pm 4,96 \times 10^5$ | $5,39 \times 10^6$ $\pm 2,22 \times 10^5$ |



Rycina 3 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej. $\chi^2=37339797$, $p < 0,0001$

Tabela 6 Porównanie liczby bakterii zawartych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej.

| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|--|--|--|--|--|--|
| CD | $2,31 \times 10^5$ $\pm 3,02 \times 10^4$ | $3,15 \times 10^7$ $\pm 1,02 \times 10^4$ | $9,71 \times 10^6$ $\pm 3,37 \times 10^4$ | $1,43 \times 10^6$ $\pm 1,24 \times 10^4$ | $7,76 \times 10^6$ $\pm 6,85 \times 10^4$ | $1,33 \times 10^6$ $\pm 2,37 \times 10^4$ |
| UC | $5,13 \times 10^2$ $\pm 1,25 \times 10^3$ | $7,14 \times 10^7$ $\pm 1,03 \times 10^5$ | $5,55 \times 10^6$ $\pm 2,08 \times 10^4$ | $1,27 \times 10^6$ $\pm 7,97 \times 10^4$ | $7,30 \times 10^6$ $\pm 1,16 \times 10^5$ | $1,07 \times 10^6$ $\pm 1,00 \times 10^5$ |
| kontrola | $1,63 \times 10^6$ $\pm 1,42 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^8$ $\pm 1,99 \times 10^4$ | $1,94 \times 10^7$ $\pm 3,71 \times 10^4$ | $6,82 \times 10^5$ $\pm 5,36 \times 10^5$ | $1,01 \times 10^7$ $\pm 8,20 \times 10^5$ | $5,39 \times 10^6$ $\pm 7,62 \times 10^4$ |

Porównując średni procentowy udział poszczególnych rodzajów bakterii w próbkach tkanki jelitowej u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej (rycina 2) zaobserwowano następujące zależności:

- u chorych z CD w miejscu zmienionym zapalnie dominowały bakterie z rodzaju *Streptococcus*, które stanowiły 78,51% wszystkich wyhodowanych bakterii.
- u chorych z UC w miejscu zmienionym zapalnie dominowały bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, które stanowiły 89,8% wszystkich wyhodowanych

bakterii, natomiast odsetek *Enterobacteriaceae* był znikomy i wynosił 0,48%.

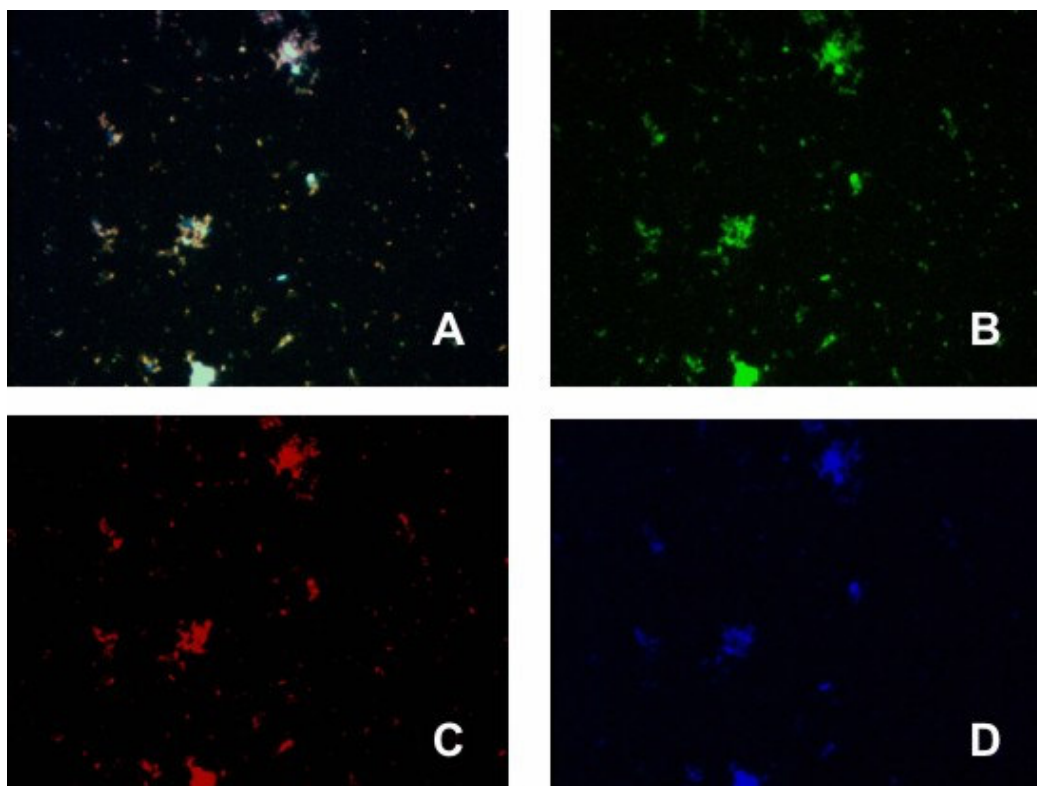
- w grupie kontrolnej dominowały bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, których udział wynosił 78,95%, podczas gdy u pacjentów z CD i UC przekraczał nieznacznie 5%.
- całkowity udział zawartości bakterii w miejscu zmienionym zapalnie, w danej jednostce chorobowej, w porównaniu do grupy kontrolnej był charakterystyczny dla tej jednostki, a zależność ta była statystycznie istotna (test Chi kwadrat).

Średni procentowy udział poszczególnych rodzajów bakterii u dzieci z IBD w tkance pobranej z miejsca niezmienionego zapalnie w porównaniu do miejsca niezmienionego chorobowo dzieci z grupy kontrolnej (rycina 3) wykazywał następujące zależności:

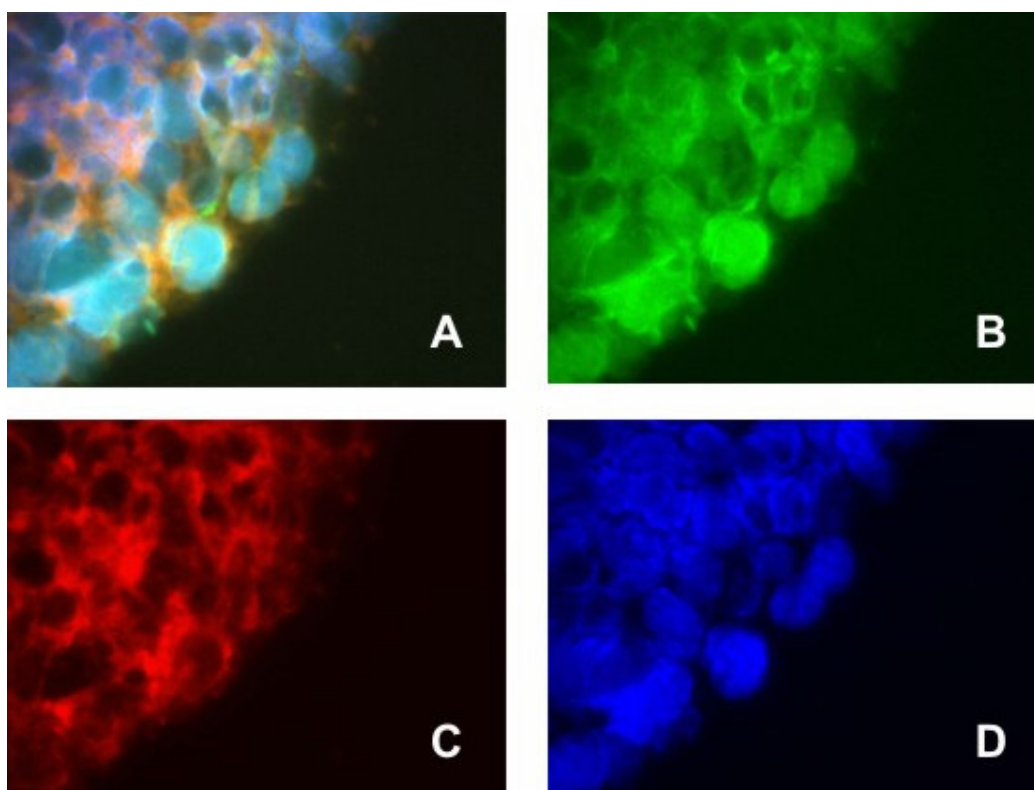
- generalnie porównując ilościowe udziały bakterii w próbkach tkanek pobranych z miejsc niezmienionych zapalnie od chorych na IBD oraz w grupie kontrolnej, stwierdzono wysokie podobieństwo udziałów ilościowych bakterii należących do tych samych grup taksonomicznych.
- w próbkach pobranych od chorych z CD i z UC oraz w grupie kontrolnej dominowały bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*; w grupie CD ich zawartość wynosiła 60,6%, natomiast w grupie UC i kontrolnej odpowiednio 82,45% i 78,95%.
- u dzieci z CD, UC i z grupy kontrolnej odsetek *Streptococcus* był porównywalny i nie przekraczał 3%.
- udział zawartości bakterii w miejscu niezmienionym zapalnie w danej jednostce chorobowej, jak i w grupie kontrolnej był charakterystyczny dla tej jednostki, a zależność ta była statystycznie istotna (test Chi kwadrat).

Ilościowe badanie bakteriologiczne próbek tkanki przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ – FISH.

Przeprowadzono próby zastosowania metody FISH w celu określenia liczby komórek bakteryjnych adherujących do błony śluzowej jelita grubego dzieci z IBD. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 4 i 5.



Rycina 4 FISH z homogenatu tkanki. Powiększenie 1000x. (A) – obraz powstały z nałożenia trzech obrazów B, C i D; (B) – obraz uzyskany z barwienia sondą EUB znakowaną FITC; (C) – obraz uzyskany z sondy ECOLI znakowanej CY3; (D) – obraz uzyskany z barwnika DAPI.



Rycina 5 FISH ze skrawków tkanki. Powiększenie 1000x. (A) – obraz powstały z nałożenia trzech obrazów B, C i D; (B) – obraz uzyskany z barwienia sondą EUB znakowaną FITC; (C) – obraz uzyskany z sondy ECOLI znakowanej CY3; (D) – obraz uzyskany z barwnika DAPI.

Wykonano osiem prób oznaczenia liczby bakterii w homogenatach tkanek uzyskanych od dzieci z grupy kontrolnej i z grupy badanej. Niestety, w żadnym przypadku nie udało się zaobserwować komórek bakteryjnych, mimo zastosowania sondy EUB, specyficznej dla wszystkich gatunków bakterii. W preparatach mikroskopowych obserwowano jedynie niespecyficzne świecenie resztek tkanki, która wykazuje tendencję do autofluorescencji (rycina 4).

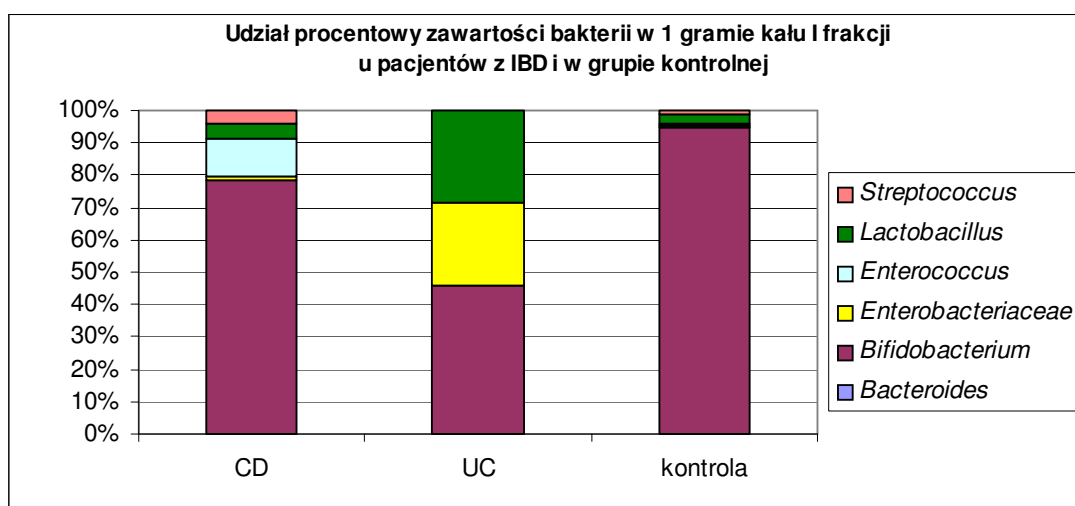
Analogiczne badania przeprowadzono na skrawkach tkanek histologicznych uzyskanych z cięcia na kriostacie. Również w tym przypadku nie obserwowano żadnych bakterii (rycina 5).

Pomimo zastosowania metody badania molekularnego FISH, nie udało się wykazać obecności bakterii w badanych próbkach tkanek.

5.2.1.2 Próbki kału.

Ilościowy posiew bakteriologiczny próbek kału.

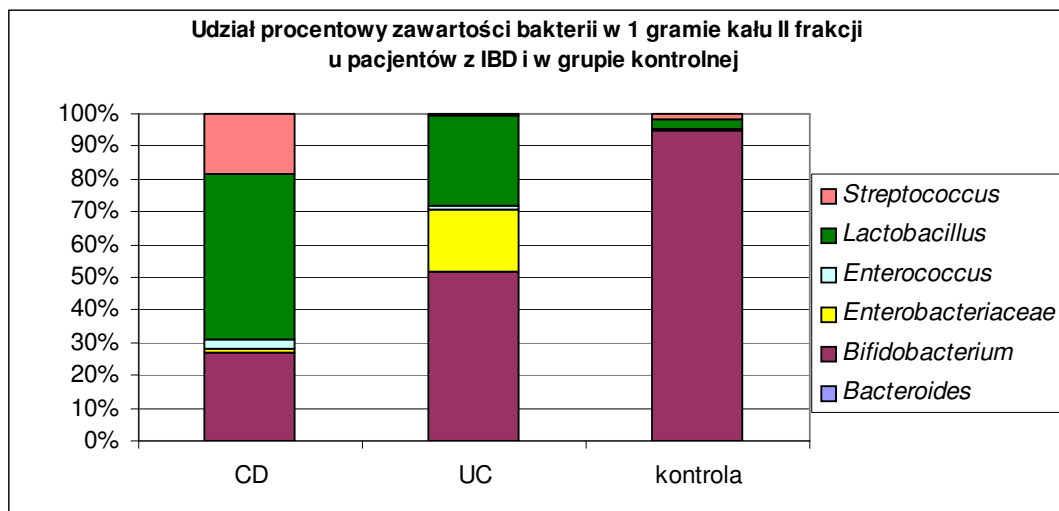
Podobnie jak w przypadku próbek tkanki, zbiorcze wyniki posiewu bakteriologicznego próbek kału poszczególnych frakcji, uzyskanych od badanych pacjentów przedstawiono w stosunku procentowym na poniższych rycinach. Dodatkowo załączono tabele, w których przedstawiono bezwzględne liczby bakterii korespondujące z tymi wykresami.



Rycina 6 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=644910000$, $p < 0,0001$

Tabela 7 Porównanie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej I frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)

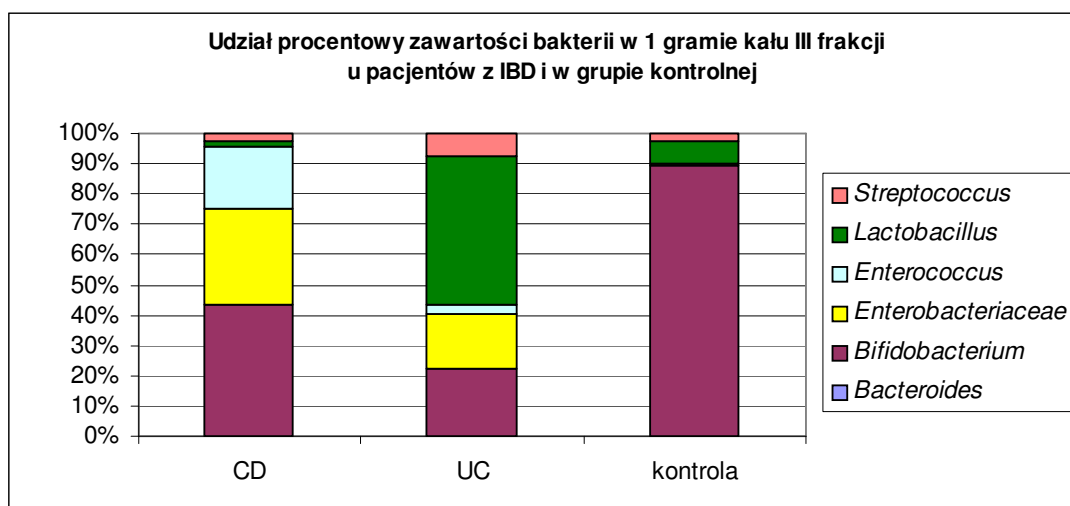
| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|--|--|--|--|--|--|
| CD | $1,0 \times 10^3$ $\pm 2,08 \times 10^2$ | $9,63 \times 10^8$ $\pm 4,45 \times 10^6$ | $1,61 \times 10^7$ $\pm 7,92 \times 10^4$ | $1,36 \times 10^8$ $\pm 3,46 \times 10^5$ | $5,73 \times 10^7$ $\pm 2,51 \times 10^5$ | $5,31 \times 10^7$ $\pm 1,36 \times 10^5$ |
| UC | $1,0 \times 10^3$ $\pm 1,04 \times 10^2$ | $5,99 \times 10^7$ $\pm 3,45 \times 10^5$ | $3,29 \times 10^7$ $\pm 1,90 \times 10^5$ | $3,20 \times 10^4$ $\pm 1,16 \times 10^2$ | $3,73 \times 10^7$ $\pm 2,15 \times 10^5$ | $1,53 \times 10^4$ $\pm 8,83 \times 10^1$ |
| kontrola | $5,38 \times 10^5$ $\pm 1,07 \times 10^3$ | $2,21 \times 10^9$ $\pm 4,63 \times 10^6$ | $1,07 \times 10^7$ $\pm 1,38 \times 10^4$ | $2,35 \times 10^7$ $\pm 4,61 \times 10^4$ | $5,79 \times 10^7$ $\pm 1,21 \times 10^5$ | $3,26 \times 10^7$ $\pm 3,63 \times 10^4$ |



Rycina 7 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=2076100000$, $p < 0,0001$

Tabela 8 Porównanie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej II frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)

| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|--|--|--|--|---|--|
| CD | $1,0 \times 10^3$ $\pm 3,12 \times 10^1$ | $2,69 \times 10^8$ $\pm 1,14 \times 10^6$ | $1,05 \times 10^7$ $\pm 2,58 \times 10^4$ | $2,45 \times 10^7$ $\pm 9,29 \times 10^5$ | $5,01 \times 10^8$ $\pm 2,019 \times 10^6$ | $1,82 \times 10^8$ $\pm 7,53 \times 10^5$ |
| UC | $1,0 \times 10^3$ $\pm 2,05 \times 10^2$ | $8,30 \times 10^7$ $\pm 2,44 \times 10^5$ | $3,00 \times 10^7$ $\pm 1,43 \times 10^5$ | $2,52 \times 10^6$ $\pm 1,43 \times 10^4$ | $4,38 \times 10^7$ $\pm 1,68 \times 10^5$ | $9,16 \times 10^5$ $\pm 4,99 \times 10^3$ |
| kontrola | $1,37 \times 10^5$ $\pm 3,79 \times 10^2$ | $2,17 \times 10^9$ $\pm 4,97 \times 10^6$ | $1,17 \times 10^7$ $\pm 1,47 \times 10^4$ | $3,14 \times 10^6$ $\pm 3,22 \times 10^3$ | $6,87 \times 10^7$ $\pm 1,28 \times 10^5$ | $3,46 \times 10^7$ $\pm 3,75 \times 10^4$ |



Rycina 8 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=1305200000$, $p < 0,0001$

Tabela 9 Porównanie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej III frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)

| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|--|--|--|--|--|--|
| CD | $1,60 \times 10^4$ $\pm 3,89 \times 10^3$ | $5,96 \times 10^8$ $\pm 8,09 \times 10^5$ | $4,31 \times 10^8$ $\pm 2,58 \times 10^4$ | $2,86 \times 10^8$ $\pm 7,39 \times 10^5$ | $2,46 \times 10^7$ $\pm 6,46 \times 10^4$ | $3,21 \times 10^7$ $\pm 4,35 \times 10^4$ |
| UC | $1,0 \times 10^3$ $\pm 3,76 \times 10^2$ | $1,32 \times 10^7$ $\pm 3,90 \times 10^4$ | $1,06 \times 10^7$ $\pm 4,74 \times 10^4$ | $2,07 \times 10^6$ $\pm 8,89 \times 10^3$ | $2,90 \times 10^7$ $\pm 8,82 \times 10^4$ | $4,53 \times 10^6$ $\pm 1,27 \times 10^4$ |
| kontrola | $7,33 \times 10^5$ $\pm 1,96 \times 10^4$ | $1,11 \times 10^9$ $\pm 2,74 \times 10^6$ | $4,96 \times 10^6$ $\pm 6,30 \times 10^3$ | $3,77 \times 10^6$ $\pm 6,49 \times 10^3$ | $9,33 \times 10^7$ $\pm 1,82 \times 10^5$ | $2,93 \times 10^7$ $\pm 4,63 \times 10^4$ |

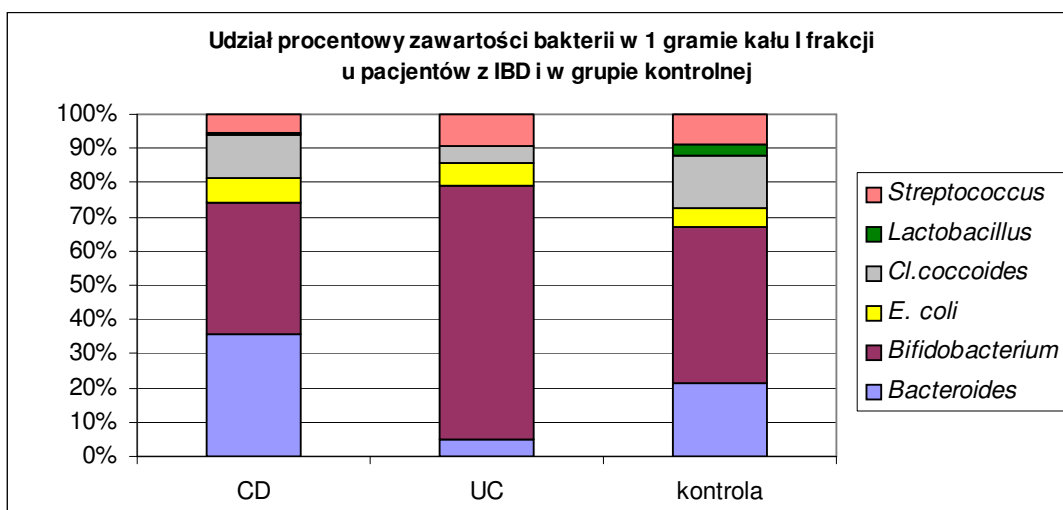
Porównując średni procentowy udział poszczególnych rodzajów bakterii obecnych w próbkach kału wszystkich trzech frakcji u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano następujące zależności:

- w grupie IBD, w kolejnych frakcjach kału następował sukcesywny spadek udziału *Bifidobacterium* w globalnej mikroflorze bakteryjnej natomiast w przypadku frakcji kału pochodzących od dzieci z grupy kontrolnej, zaznaczył się tylko niewielki spadek udziału *Bifidobacterium*, poczynając od 94,64% zawartości w I frakcji do 88,48% w III frakcji kału (ryciny 6 - 8).

- u chorych na UC dała się zauważyć tendencja do zwiększania się udziału bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jako składnika mikroflory, w miarę zbliżania się do śluzówki jelita (ryciny 2, 6 - 8).
- w III frakcji kału u chorych na CD zwiększył się udział bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* do 31,5%, natomiast w przypadku pacjentów z UC, zaznaczyła się niewielka tendencja spadkowa poczynając od 25% w I frakcji i kończąc na 17,9% w frakcji III kału
- generalnie, w próbkach kału wszystkich trzech frakcji pochodzących od pacjentów z grupy kontrolnej, nie stwierdzono żadnych istotnych zmian składu mikroflory bakteryjnej.
- całkowity rozkład zawartości bakterii we wszystkich trzech frakcjach kału w danej jednostce chorobowej, jak i w grupie kontrolnej był charakterystyczny dla tej jednostki, a zależność ta była statystycznie istotna (test Chi kwadrat).

Ilościowe badanie bakteriologiczne próbek kału, przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – FISH.

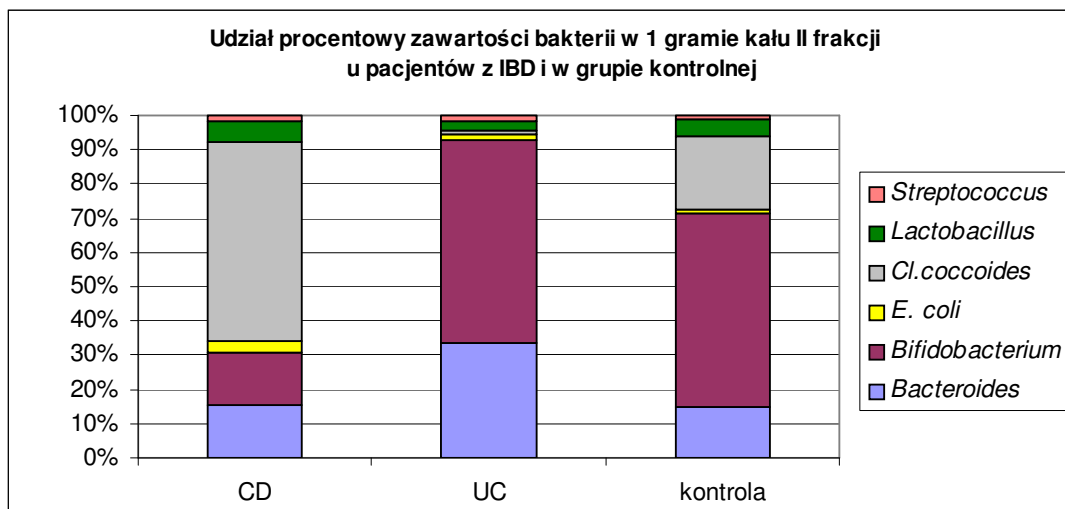
Przeprowadzono badanie analogiczne jak w przypadku posiewu próbek masy kałowej, z tym że wykorzystano metodę FISH, aby określić zawartość poszczególnych grup bakterii w kolejnych frakcjach kału w grupach badanych dzieci.



Rycina 9 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=2956200000$, $p < 0,0001$

Tabela 10 Zestawienie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej I frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)

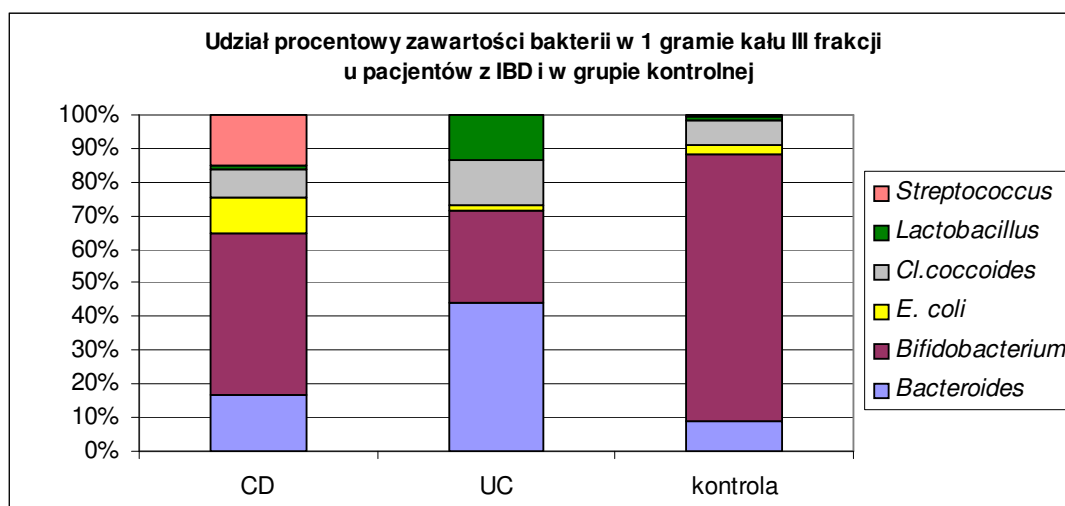
| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>E. coli</i> | <i>Cl.coccoides</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|---|---|---|---|---|---|
| CD | $1,06 \times 10^{10}$ $\pm 6,17 \times 10^6$ | $1,13 \times 10^{10}$ $\pm 6,45 \times 10^5$ | $2,12 \times 10^9$ $\pm 2,40 \times 10^5$ | $3,71 \times 10^9$ $\pm 1,06 \times 10^4$ | $2,34 \times 10^8$ $\pm 1,35 \times 10^5$ | $1,63 \times 10^9$ $\pm 6,15 \times 10^5$ |
| UC | $8,51 \times 10^8$ $\pm 8,51 \times 10^5$ | $1,23 \times 10^{10}$ $\pm 2,90 \times 10^7$ | $1,14 \times 10^9$ $\pm 3,04 \times 10^5$ | $7,95 \times 10^8$ $\pm 1,75 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^3$ $\pm 1,25 \times 10^5$ | $1,56 \times 10^9$ $\pm 2,11 \times 10^6$ |
| kontrola | $6,34 \times 10^{10}$ $\pm 7,67 \times 10^7$ | $1,33 \times 10^{11}$ $\pm 1,12 \times 10^7$ | $1,63 \times 10^{10}$ $\pm 3,45 \times 10^6$ | $4,53 \times 10^{10}$ $\pm 3,37 \times 10^6$ | $1,03 \times 10^{10}$ $\pm 1,51 \times 10^6$ | $2,59 \times 10^{10}$ $\pm 5,70 \times 10^6$ |



Rycina 10 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=382390000$, $p < 0,0001$

Tabela 11 Zestawienie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej II frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)

| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>E. coli</i> | <i>Cl. coccoides</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|---|--|--|---|--|--|
| CD | $7,49 \times 10^9$ $\pm 2,35 \times 10^6$ | $7,70 \times 10^9$ $\pm 1,62 \times 10^6$ | $1,59 \times 10^9$ $\pm 1,42 \times 10^7$ | $2,89 \times 10^{10}$ $\pm 4,83 \times 10^5$ | $3,01 \times 10^9$ $\pm 8,65 \times 10^5$ | $8,03 \times 10^8$ $\pm 3,58 \times 10^5$ |
| UC | $4,13 \times 10^{10}$ $\pm 2,90 \times 10^7$ | $7,31 \times 10^{10}$ $\pm 44,42 \times 10^7$ | $2,12 \times 10^9$ $\pm 9,74 \times 10^5$ | $1,56 \times 10^9$ $\pm 1,87 \times 10^5$ | $2,99 \times 10^9$ $\pm 1,50 \times 10^6$ | $2,27 \times 10^9$ $\pm 1,77 \times 10^5$ |
| kontrola | $2,63 \times 10^{10}$ $\pm 4,05 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^{11}$ $\pm 8,95 \times 10^6$ | $1,39 \times 10^9$ $\pm 3,13 \times 10^6$ | $3,76 \times 10^{10}$ $\pm 2,28 \times 10^5$ | $8,81 \times 10^9$ $\pm 1,72 \times 10^6$ | $2,18 \times 10^9$ $\pm 1,78 \times 10^5$ |



Rycina 11 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=324390000$, $p < 0,0001$

Tabela 12 Zestawienie liczby bakterii zawartych w 1 gramie masy kałowej III frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)

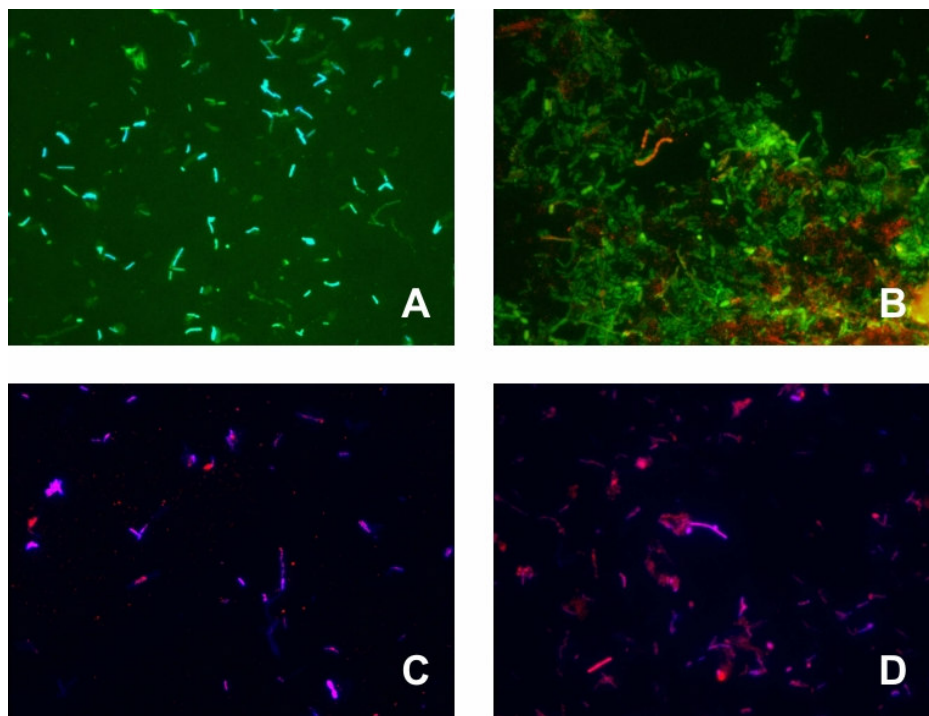
| cfu/g | <i>Bacteroides</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>E. coli</i> | <i>Cl.coccoides</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus</i> |
|----------|---|---|---|---|--|---|
| CD | $2,51 \times 10^{10}$ $\pm 2,32 \times 10^6$ | $7,02 \times 10^{10}$ $\pm 9,06 \times 10^6$ | $1,58 \times 10^{10}$ $\pm 2,50 \times 10^6$ | $1,23 \times 10^{10}$ $\pm 3,90 \times 10^6$ | $2,34 \times 10^9$ $\pm 5,30 \times 10^5$ | $2,18 \times 10^{10}$ $\pm 3,72 \times 10^6$ |
| UC | $1,32 \times 10^{10}$ $\pm 5,97 \times 10^6$ | $8,18 \times 10^9$ $\pm 3,49 \times 10^6$ | $5,26 \times 10^8$ $\pm 1,88 \times 10^6$ | $4,04 \times 10^9$ $\pm 3,04 \times 10^5$ | $3,85 \times 10^9$ $\pm 1,33 \times 10^6$ | $7,97 \times 10^7$ $\pm 2,74 \times 10^4$ |
| kontrola | $1,19 \times 10^{10}$ $\pm 1,57 \times 10^6$ | $1,09 \times 10^{11}$ $\pm 1,37 \times 10^7$ | $4,21 \times 10^9$ $\pm 2,64 \times 10^6$ | $9,93 \times 10^9$ $\pm 9,22 \times 10^5$ | $1,72 \times 10^9$ $\pm 3,64 \times 10^6$ | $5,93 \times 10^8$ $\pm 7,91 \times 10^4$ |

Porównując średni procentowy udział poszczególnych rodzajów bakterii obecnych w próbkach kału poszczególnych trzech frakcji u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano następujące zależności:

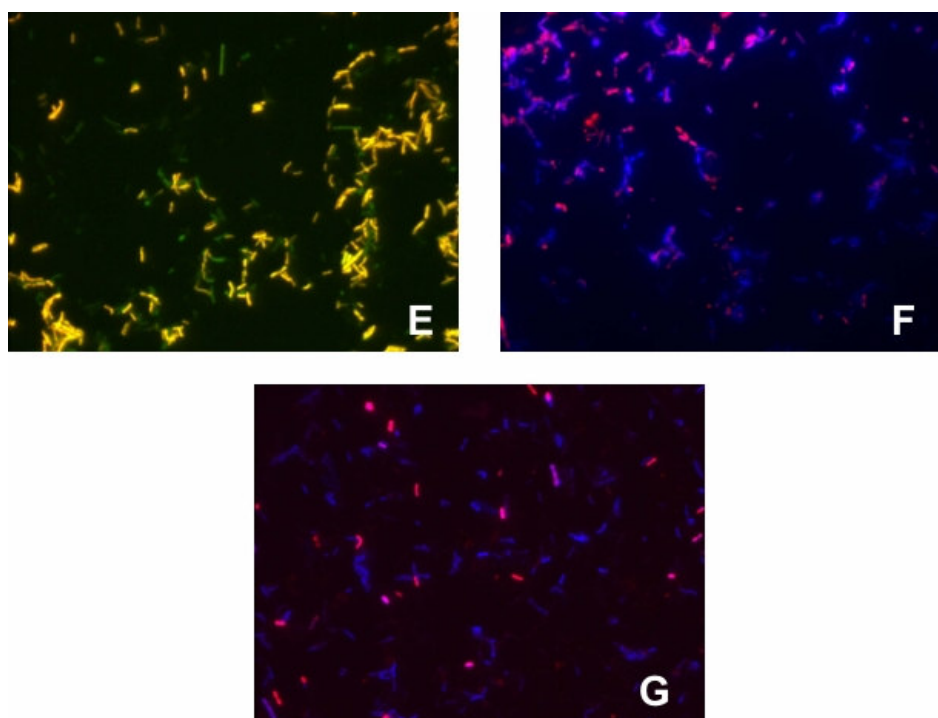
- w I frakcji kału rozkład ilościowy badanych grup bakterii był podobny u wszystkich chorych z IBD oraz w grupie kontrolnej (rycina 9)
- w III frakcji kału, kontaktującej się bezpośrednio z błoną śluzową jelita, wykazano zmniejszenie się udziału bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* u chorych z IBD w porównaniu do grupy kontrolnej (CD 47,59%; UC 27,37%; kontrola 79,37%) (rycina 11).

- u chorych z UC zwiększyła się procentowa zawartość bakterii z rodzaju *Bacteroides* w ogólnej puli bakterii, w miarę przechodzenia do kolejnych frakcji kału. Zależność została odwrócona w przypadku grupy kontrolnej. (ryciny 9 – 11).
- w III frakcji kału pochodzącego od grupy dzieci z CD zwiększył się udział bakterii z rodzaju *Streptococcus* oraz z gatunku *Escherichia coli* zarówno w stosunku do grupy kontrolnej jak i poprzedzających frakcji. Dodatkowo wykazano analogiczną prawidłowość w przypadku bakterii z rodzaju *Lactobacillus* u pacjentów z UC (ryciny 9 – 11).
- całkowity rozkład zawartości bakterii we wszystkich trzech frakcjach kału w danej jednostce chorobowej jak i w grupie kontrolnej był charakterystyczny dla tej jednostki, a zależność ta była statystycznie istotna (test Chi kwadrat).

Na poniższych rycinach przedstawiono obrazy uzyskane z mikroskopu fluorescencyjnego, dla każdej z siedmiu sond, w wyniku badania próbek kału przy użyciu metody FISH.



Rycina 12 FISH z próbek kału. Powiększenie 1000x. (A) – kombinacja sond EUB+DAPI; (B) – kombinacja sond STREP+EUB; (C) – kombinacja sond ECOLI+DAPI; (D) – kombinacja sond Lab158+DAPI.



Rycina 13 FISH z próbek kału. Powiększenie 1000x. (E) – kombinacja sond Bif164+EUB; (F) - kombinacja sond BAC303+DAPI; (G) – kombinacja sond Erec+DAPI.

5.2.2 Udział procentowy zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w poszczególnych typach badanych próbek.

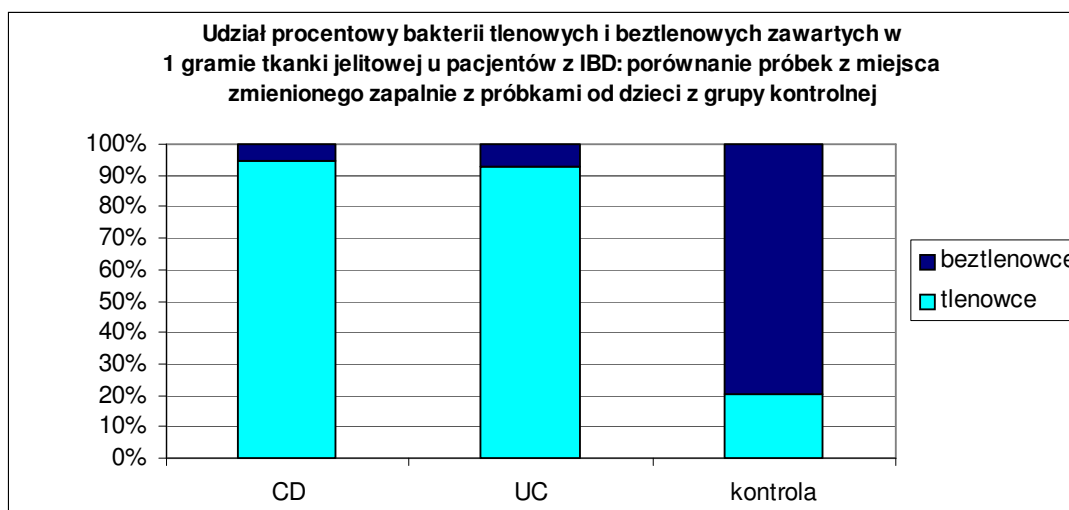
5.2.2.1 Tkanka jelitowa.

Relacje pomiędzy liczbami bakterii beztlenowych i tlenowych w próbkach tkanki jelitowej badane za pomocą metody hodowli.

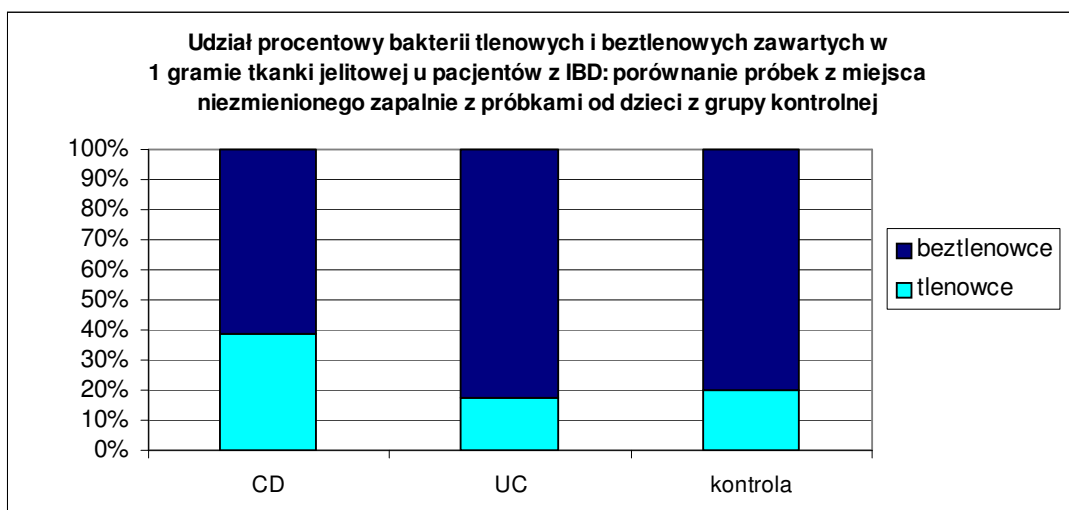
Relacje pomiędzy liczbami bakterii beztlenowych i tlenowych w próbkach tkanek pobranych od badanych pacjentów przedstawiono w ujęciu procentowym na poniższych rycinach. Dodatkowo przedstawiono tabelę z bezwzględnymi liczbami bakterii.

Do drobnoustrojów beztlenowych zaliczono wszystkie bakterie, których wzrost uzyskano w warunkach hodowli beztlenowej, a które nie dawały się hodować w obecności tlenu atmosferycznego, głównie były to bakterie należące

do rodzajów *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. Do bakterii tlenowych zaliczono wszystkie drobnoustroje dające się wyhodować w warunkach tlenowych oraz względnie beztlenowe bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, których hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych.



Rycina 14 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=255000000$, $p < 0,0001$



Rycina 15 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=253000000$, $p < 0,0001$

Tabela 13 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych zawartych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca zmienionego zapalnie i prawidłowego (metoda posiewu).

| cfu/g | miejsce zmienione zapalnie | | miejsce prawidłowe | |
|----------|--|--|--|--|
| | beztlenowce | tlenowce | beztlenowce | tlenowce |
| CD | $8,74 \times 10^6$ $\pm 1,76 \times 10^4$ | $1,55 \times 10^8$ $\pm 3,67 \times 10^6$ | $3,17 \times 10^7$ $\pm 9,08 \times 10^5$ | $2,02 \times 10^7$ $\pm 5,78 \times 10^5$ |
| UC | $7,56 \times 10^6$ $\pm 7,89 \times 10^5$ | $9,57 \times 10^7$ $\pm 8,78 \times 10^5$ | $7,14 \times 10^7$ $\pm 2,08 \times 10^5$ | $1,52 \times 10^7$ $\pm 4,76 \times 10^4$ |
| kontrola | $1,41 \times 10^8$ $\pm 4,67 \times 10^6$ | $3,55 \times 10^7$ $\pm 7,09 \times 10^6$ | $1,41 \times 10^8$ $\pm 4,76 \times 10^6$ | $3,55 \times 10^7$ $\pm 5,98 \times 10^5$ |

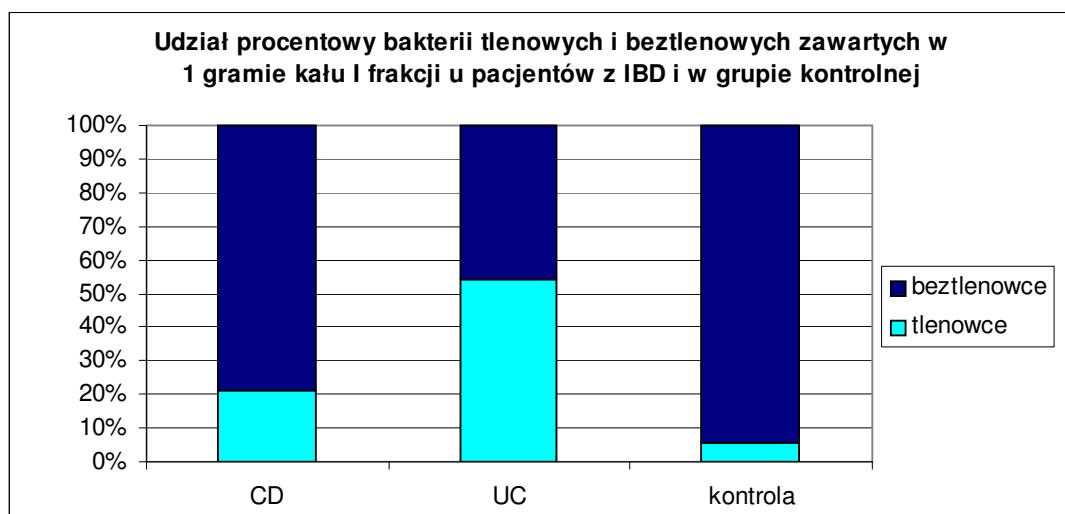
Porównując średni procentowy udział bakterii tlenowych i beztlenowych w próbkach tkanki jelitowej u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano następujące zależności:

- zarówno u dzieci z CD, jak i z UC w miejscach zmienionych zapalnie znacznie przeważały bakterie tlenowe, gdzie ich odsetek wynosił odpowiednio 94,6% i 92,6%, zaś w grupie kontrolnej tylko 20,1% (rycina 14).
- zawartość bakterii tlenowych w miejscu niezmienionym zapalnie u pacjentów z CD i z UC była znacznie niższa i wynosiła 39,0% i 17,5% (rycina 15).
- rozkład zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w miejscu zmienionym zapalnie, jak i prawidłowym, w danej jednostce chorobowej, jak i w grupie kontrolnej był charakterystyczny dla tej jednostki, a zależność ta była statystycznie istotna (test Chi kwadrat).

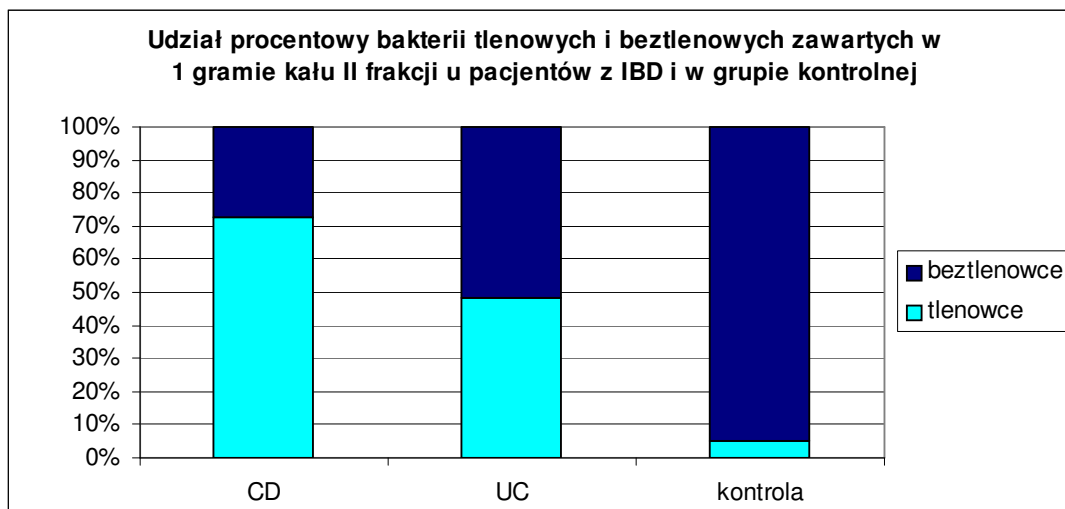
5.2.2.2 Próbki kału.

Relacje pomiędzy liczbami bakterii beztlenowych i tlenowych w próbkach kału zbadane za pomocą metody hodowli.

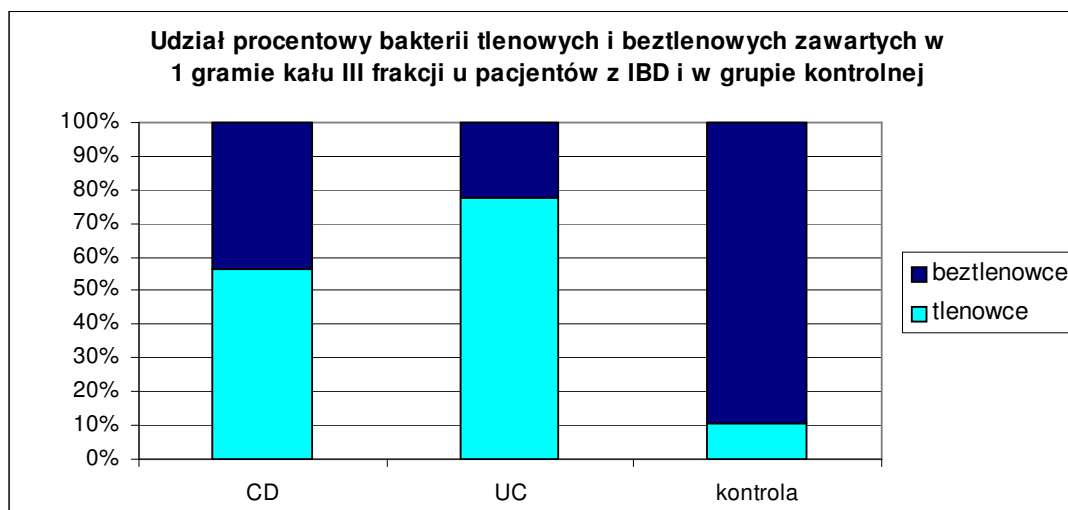
Analogicznie jak w przypadku próbek tkanki, proporcje bakterii tlenowych i beztlenowych w próbkach kału poszczególnych trzech frakcji, uzyskanych od badanych pacjentów przedstawiono w stosunku procentowym na poniższych rycinach. Dodatkowo załączono tabelę korespondującą z wykresami, w której zamieszczono bezwzględne liczby bakterii.



Rycina 16 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=31300000$, $p < 0,0001$



Rycina 17 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=243000000$, $p < 0,0001$



Rycina 18 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=253000000$, $p < 0,0001$

Tabela 14 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych zawartych w 1 gramie masy kałowej, poszczególnych frakcji, pobranych od pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej (metoda posiewu).

| cfu/g | I frakcja | | II frakcja | | III frakcja | |
|----------|--|--|--|--|--|--|
| | beztlenowce | tlenowce | beztlenowce | tlenowce | beztlenowce | tlenowce |
| CD | $9,63 \times 10^8$ $\pm 4,15 \times 10^6$ | $2,62 \times 10^8$ $\pm 5,78 \times 10^5$ | $2,69 \times 10^8$ $\pm 1,09 \times 10^5$ | $7,18 \times 10^8$ $\pm 2,98 \times 10^6$ | $5,96 \times 10^8$ $\pm 3,60 \times 10^6$ | $7,73 \times 10^8$ $\pm 5,89 \times 10^5$ |
| UC | $5,99 \times 10^7$ $\pm 4,56 \times 10^4$ | $7,02 \times 10^7$ $\pm 8,15 \times 10^5$ | $8,30 \times 10^7$ $\pm 3,76 \times 10^5$ | $7,72 \times 10^7$ $\pm 1,09 \times 10^5$ | $1,32 \times 10^7$ $\pm 3,33 \times 10^5$ | $4,63 \times 10^7$ $\pm 3,78 \times 10^5$ |
| kontrola | $2,21 \times 10^9$ $\pm 2,78 \times 10^7$ | $1,25 \times 10^8$ $\pm 5,87 \times 10^6$ | $2,17 \times 10^9$ $\pm 1,11 \times 10^7$ | $1,18 \times 10^8$ $\pm 3,87 \times 10^6$ | $1,11 \times 10^9$ $\pm 5,89 \times 10^6$ | $1,31 \times 10^8$ $\pm 1,56 \times 10^5$ |

Porównując średni procentowy udział bakterii tlenowych i beztlenowych w próbkach kału wszystkich trzech frakcji, u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano następujące zależności:

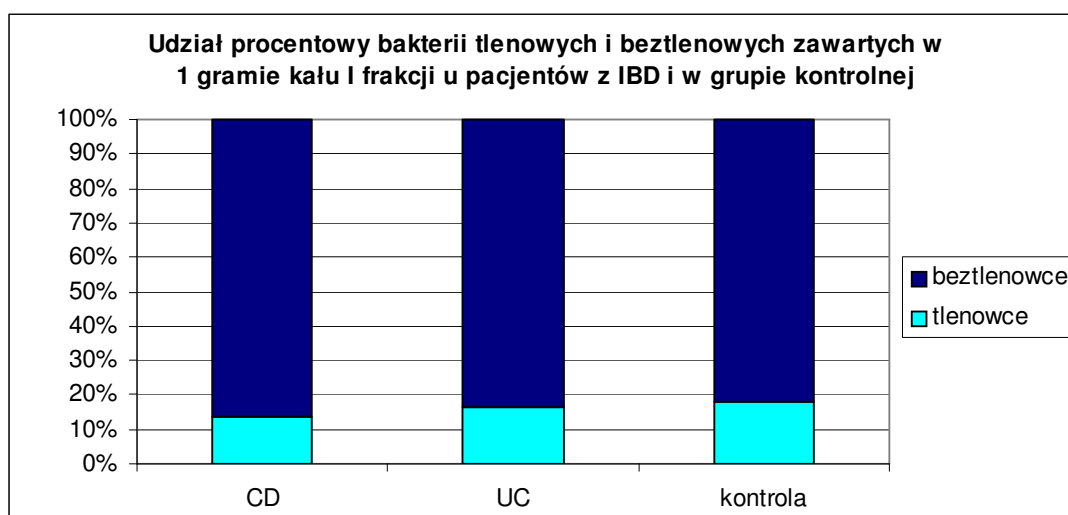
- u pacjentów z CD odsetek bakterii tlenowych wzrastał w poszczególnych frakcjach kału przyjmując wartości 21,4% dla frakcji pierwszej i 56,5% dla frakcji trzeciej kału (ryciny 16 – 18).
- podobną tendencję zaobserwowano u dzieci z UC, gdzie we frakcji pierwszej i drugiej odsetek bakterii tlenowych wynosił ok. 50%, natomiast we frakcji trzeciej, najbliższej błonie śluzowej jelita, wynosił 77,8% (ryciny 16 – 18).
- w grupie kontrolnej, we wszystkich trzech frakcjach kału, stosunek zawartości tlenowców do beztlenowców był względnie stały i wynosił odpowiednio ok. 5 – 10% do 95 – 90%.

Relacje pomiędzy liczbami bakterii beztlenowych i tlenowych w próbkach kału zbadane za pomocą metody FISH.

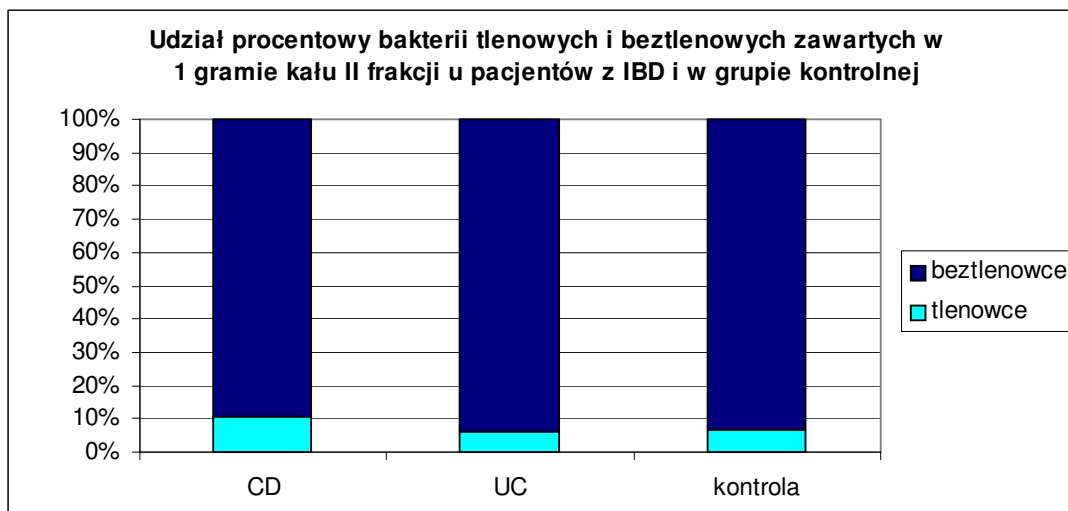
Podobnie jak w przypadku metody hodowli, tak również przy pomocy ilościowej, fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, uzyskano wyniki pozwalające na dokonanie oceny proporcji bakterii tlenowych do beztlenowych. Badanie przeprowadzono jedynie dla kału, ponieważ jak przedstawiono powyżej, metoda

FISH, ze względu na zbyt niską czułość nie pozwala na detekcję bakterii w tkance jelitowej. Uzyskane wyniki przedstawiono na poniższych rycinach oraz tabeli.

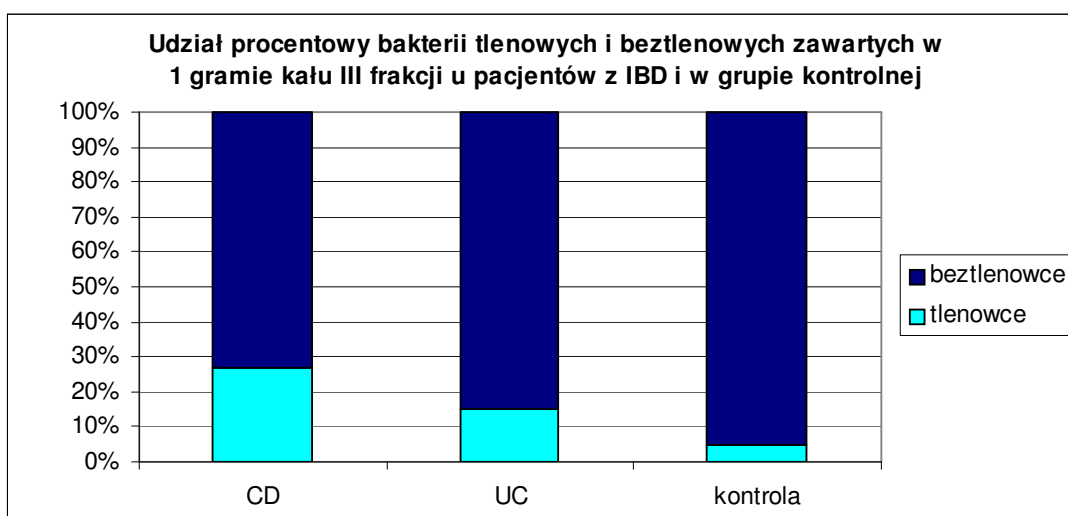
Ze względu na użyty zestaw sond, do drobnoustrojów tlenowych zaliczono wszystkie bakterie z rodzajów: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* oraz *Enterobacteriaceae*. Do bakterii beztlenowych zaliczono: *Bifidobacterium*, *Bacteroides* oraz *Clostridium coccoides*.



Rycina 19 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=6530000$, $p < 0,0001$



Rycina 20 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=23000000$, $p < 0,0001$



Rycina 21 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=4530000000$, $p < 0,0001$

Tabela 15 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych zawartych w 1 gramie masy kałowej, wszystkich trzech frakcji, pobranych od pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej (metoda FISH).

| cfu/g | I frakcja | | II frakcja | | III frakcja | |
|----------|---|---|---|---|---|---|
| | beztlenowce | tlenowce | beztlenowce | tlenowce | beztlenowce | tlenowce |
| CD | $2,56 \times 10^{10}$ $\pm 2,15 \times 10^5$ | $3,98 \times 10^9$ $\pm 1,53 \times 10^6$ | $4,41 \times 10^{10}$ $\pm 1,63 \times 10^5$ | $5,40 \times 10^9$ $\pm 1,04 \times 10^6$ | $1,08 \times 10^{11}$ $\pm 1,23 \times 10^5$ | $3,99 \times 10^{10}$ $\pm 2,11 \times 10^5$ |
| UC | $1,39 \times 10^{10}$ $\pm 3,01 \times 10^7$ | $2,70 \times 10^9$ $\pm 2,12 \times 10^6$ | $1,16 \times 10^{11}$ $\pm 3,21 \times 10^5$ | $7,38 \times 10^9$ $\pm 2,99 \times 10^5$ | $2,54 \times 10^{10}$ $\pm 3,01 \times 10^6$ | $4,45 \times 10^9$ $\pm 3,02 \times 10^6$ |
| kontrola | $2,42 \times 10^{11}$ $\pm 1,62 \times 10^5$ | $5,25 \times 10^{10}$ $\pm 3,05 \times 10^7$ | $1,64 \times 10^{11}$ $\pm 2,85 \times 10^6$ | $1,24 \times 10^{10}$ $\pm 1,53 \times 10^5$ | $1,31 \times 10^{11}$ $\pm 1,07 \times 10^5$ | $6,51 \times 10^9$ $\pm 1,10 \times 10^5$ |

Porównując proporcje bakterii tlenowych i beztlenowych w próbkach kału wszystkich trzech frakcji, u dzieci z IBD w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano następujące zależności:

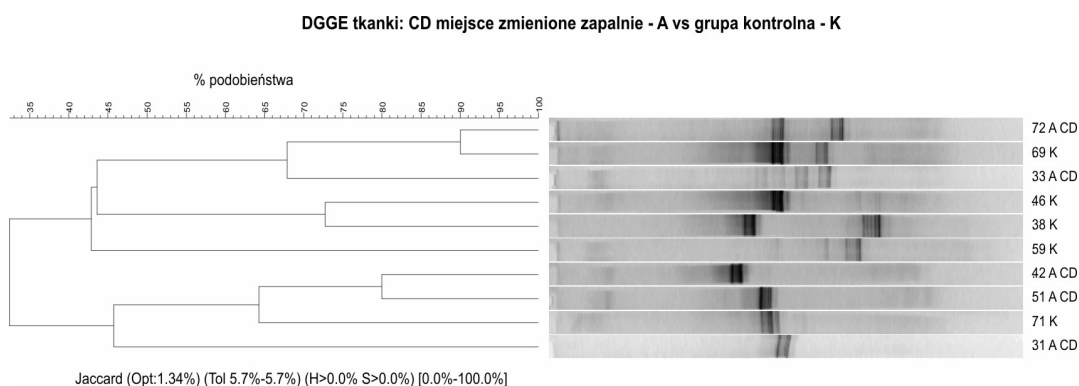
- odsetek bakterii tlenowych u dzieci z CD we frakcji I kału wynosił 13,5% i zwiększył się do 27,1% we frakcji III masy kałowej (ryciny 19 – 21).
- w przypadku grupy UC, odsetek tlenowców w I i w III frakcji wynosił ok. 15% i jedynie we frakcji II ten odsetek był niższy i wynosił 6% (ryciny 19 – 21).
- w grupie kontrolnej zaobserwowano niewielki, sukcesywny spadek odsetka bakterii tlenowych w stosunku do beztlenowych, w kolejnych frakcjach kału – 17,8% w I frakcji, 7% w II frakcji oraz 4,7% w III frakcji.

5.3 Porównanie składu gatunkowego bakterii jelitowych zawartych w próbkach pochodzących od pacjentów z CD, UC i z grupy kontrolnej przy użyciu metody DGGE.

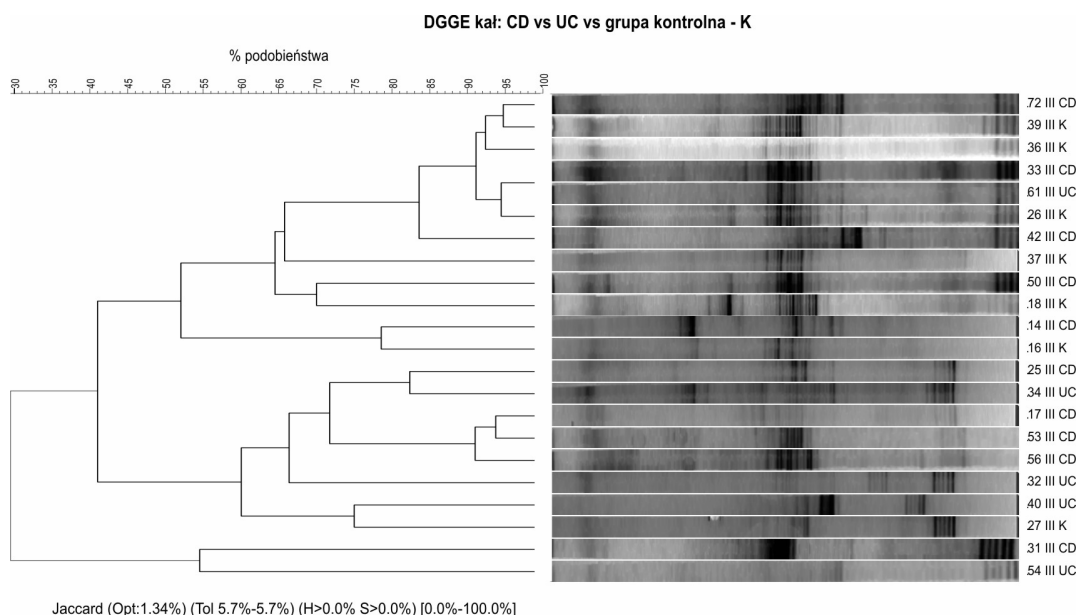
Analizę próbek wszystkich trzech frakcji masy kałowej, pochodzących od pacjentów z CD, UC i z grupy kontrolnej, za pomocą DGGE, przeprowadzono na izolatach DNA uzyskanych bezpośrednio z próbek. W przypadku bioptatów tkanek jelitowych izolację DNA bakteryjnego przeprowadzono z płynnego podłoża Schaedlera w którym hodowano próbki tkanek z zaadherowanymi bakteriami.

Na podstawie otrzymanych profili prążków przeprowadzono porównanie podobieństwa gatunkowego składu flory bakteryjnej dla poszczególnych frakcji kału w obrębie obu podjednostek chorobowych IBD i grupy kontrolnej osobno, jak i porównanie każdej frakcji kału pomiędzy CD, UC i w grupie kontrolnej. Ponadto,, dokonano analizy podobieństwa flory bakteryjnej przywartej do wycinków błony śluzowej jelita zarówno zmienionego zapalnie, jak i makroskopowo prawidłowego pomiędzy pacjentami z CD, UC i w grupie kontrolnej. Wszystkich analiz dokonano przy użyciu oprogramowania GelCompar II.

Analizując podobieństwa pomiędzy poszczególnymi próbkami, zastosowano współczynnik podobieństwa Jaccarda. W rezultacie uzyskano dendrogramy, przedstawiające w sposób graficzny procentowy stopień podobieństwa zawartości gatunkowej bakterii w badanych próbkach. Na poniższych rycinach przedstawiono przykładowe dendrogramy otrzymane dla próbek tkanki i kału.



Rycina 22 Stopień podobieństwa składu gatunkowego flory bakteryjnej przywartej do śluzówki jelita dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna i dzieci z grupy kontrolnej (DNA izolowane po hodowli bakterii).



Rycina 23 Stopień podobieństwa składu gatunkowego flory bakteryjnej III frakcji kału u dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna, z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i dzieci z grupy kontrolnej (DNA izolowane bezpośrednio z próbek kału).

Analiza otrzymanych dendrogramów wykazała, iż:

- brak jest istotnych podobieństw składu gatunkowego flory bakteryjnej w obrębie grup pacjentów z CD, UC i w grupie kontrolnej zarówno w próbkach kału jak i w badanych tkankach.
- stwierdzono, że rozkład poszczególnych profili prążków na dendrogramie jest przypadkowy lub silnie zindywidualizowany i nie można z całą

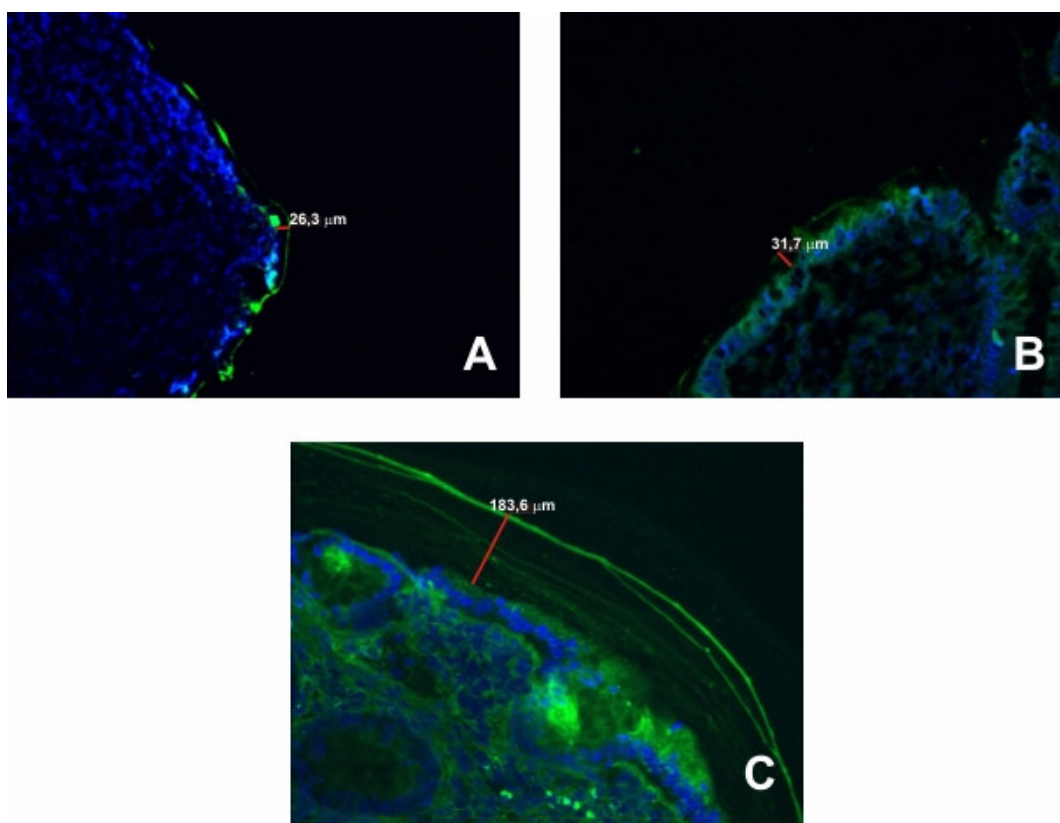
pewnością powiedzieć, że istnieją różnice pomiędzy jakościową zawartością bakterii w poszczególnych frakcjach kału w badanych grupach chorych.

- tak samo, nie wykazano różnic w zawartości gatunkowej bakterii w badanych bioptatach tkanek pochodzących z jelit pacjentów cierpiących na CD, UC w porównaniu do grupy kontrolnej.
- brak także było istotnych różnic pomiędzy tkankami pochodzącymi z miejsca makroskopowo prawidłowego i zmienionego zapalnie u pacjentów chorych na CD jak i na UC.

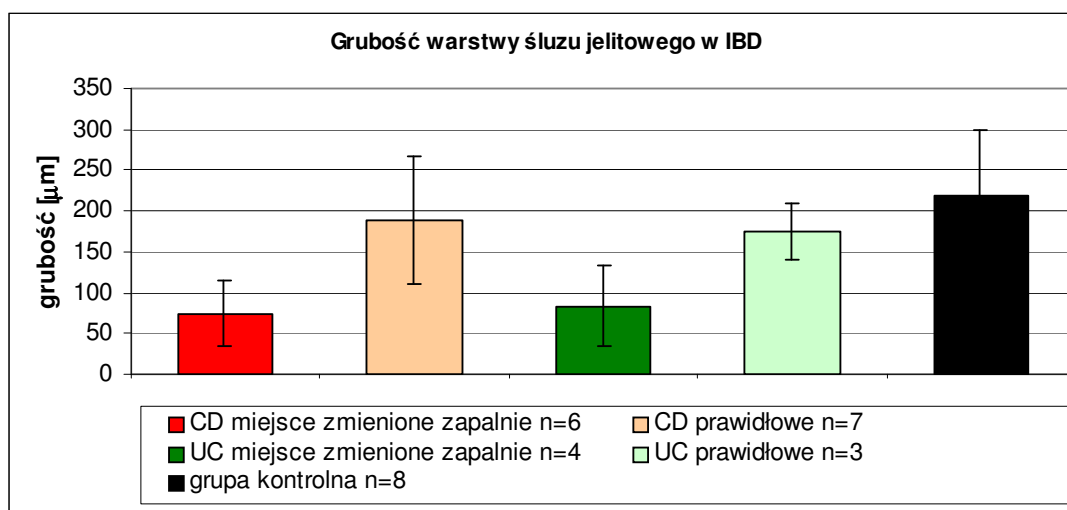
5.4 Ocena warstwy śluzu jelitowego.

5.4.1 Pomiar grubości warstwy śluzowej wytwarzanej przez śluzówkę jelita badanych pacjentów.

Na niżej zamieszczonych rycinach przedstawiono przykładowe obrazy, uzyskane z mikroskopu fluorescencyjnego, oddające różnice w grubości warstwy śluzu jelitowego, powlekającego ścianę jelita od strony jego światła u pacjentów z CD, UC oraz z grupy kontrolnej. Dodatkowo zamieszczono wykres obrazujący uśrednione wyniki porównania grubości warstwy śluzowej w próbkach tkanek pochodzących z miejsc prawidłowych, jak i zmienionych zapalnie u dzieci z badanych grup.



Rycina 24 Grubość warstwy śluzu wyścielającej światło jelita. Powiększenie 200x. (A) – skrawek tkanki z miejsca zmienionego zapalnie u pacjenta z CD; (B) – skrawek tkanki z miejsca zmienionego zapalnie u pacjenta z UC; (C) – skrawek pobrany od pacjenta z grupy kontrolnej.



Rycina 25 Porównanie grubości warstwy śluzu wyścielającej światło jelita u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.

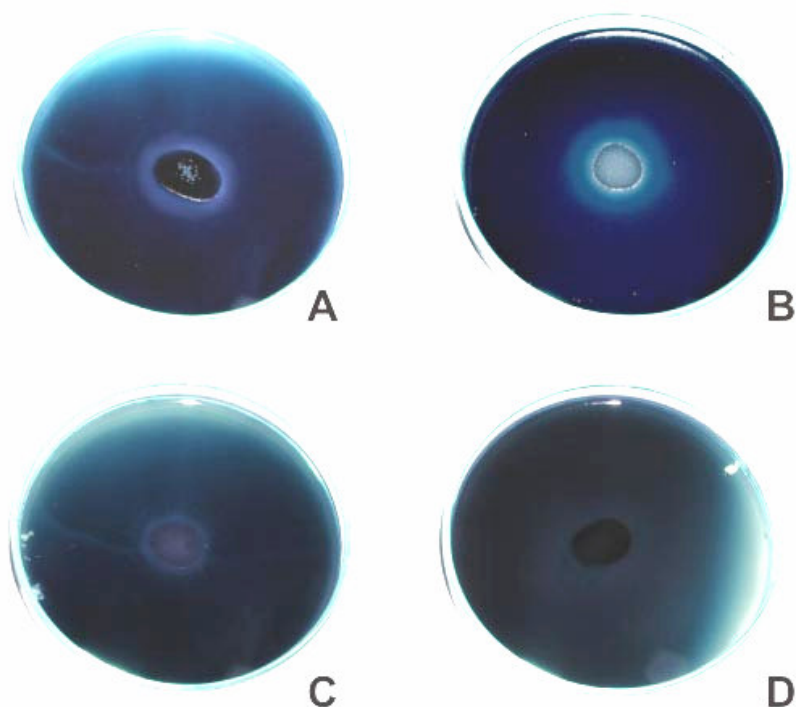
W rezultacie przeprowadzonych pomiarów grubości warstwy śluzowej wykazano że:

- grubość warstwy była około trzykrotnie mniejsza u chorych z CD oraz z UC w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej (ryciny 24 - 25). W obu grupach pacjentów różnica ta była istotna statystycznie: u chorych z CD, $p = 0,0023$ (test t-Studenta), a chorych z UC, $p = 0,0337$ (zastosowano test mediany z powodu mniejszej liczby dokonanych pomiarów).
- bardzo podobne wyniki uzyskano przy porównaniu grubości warstwy śluzowej jelita w próbkach tkanki pobranej od pacjentów z IBD z miejsca zmienionego zapalnie i makroskopowo prawidłowego. Rezultaty uzyskane dla CD były statystycznie istotne ($p = 0,0109$; test t-Studenta), zaś w przypadku dzieci z UC, wynik był bardzo zbliżony do istotności statystycznej ($p = 0,0662$; test mediany).
- dodatkowo wykazano, że grubość warstwy śluzu zmierzonej w skrawkach pobranych z miejsc niezmiennych zapalnie u pacjentów z CD i z UC była jedynie nieznacznie mniejsza niż w przypadku dzieci z grupy kontrolnej (rycina 25). Grubość warstwy śluzu w wycinkach z tych miejsc u pacjentów z CD nie różniła się istotnie od grubości warstwy śluzu pacjentów z grupy kontrolnej, podobnie jak w przypadku dzieci z UC.

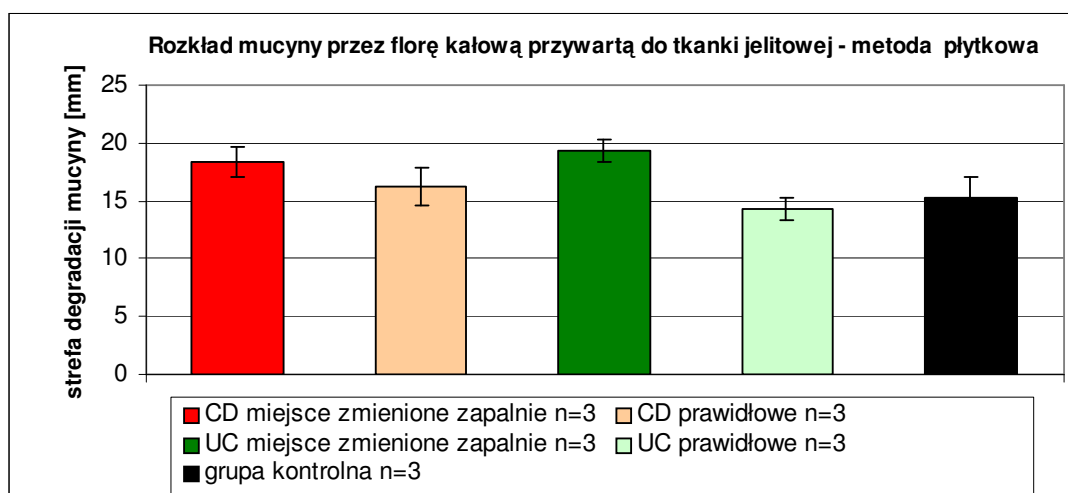
5.4.2 Badanie degradacji mucyny metodą płytkową przez florę kałową oraz przywartą do śluzówki jelita.

Badania degradacji mucyny pochodzenia jelitowego, będącej podstawowym składnikiem śluzu jelitowego, przeprowadzono dla flory kałowej III frakcji oraz flory przywartej do śluzówki jelita (bioptaty tkanek). Nie przeprowadzono analogicznych eksperymentów dla frakcji I i II kału, wychodząc z założenia, że jedynie flora bakteryjna mająca bezpośredni kontakt z błoną śluzową jelita ma wpływ na degradację śluzu jelitowego.

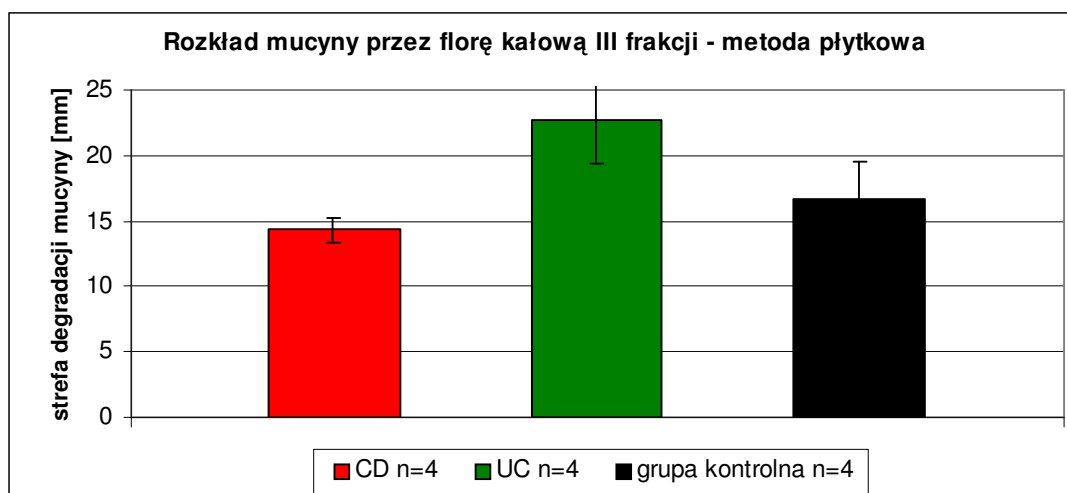
Na poniższych rycinach przedstawiono widok strefy „halo”, będącej skutkiem degradacji mucyny przez florę bakteryjną przywartą do śluzówki oraz średnie wartości średnic stref degradacji mucyny dla frakcji III kału i poszczególnych rodzajów bioptatów tkanki jelitowej.



Rycina 26 Stopień degradacji mucyny jelitowej przez florę bakteryjną adherującą do błony śluzowej jelita. Wokół kolonii widoczna strefa halo zdegradowanej mucyny. (A) – flora bakteryjna pochodząca z miejsca zmienionego zapalnie od pacjenta z CD; (B) – flora bakteryjna pochodząca z miejsca zmienionego zapalnie od pacjenta z UC; (C) – flora bakteryjna pochodząca od pacjenta z grupy kontrolnej; (D) – kontrola (flora bakteryjna pochodząca od pacjenta z CD, zabita w autoklawie) – brak strefy „halo”.



Rycina 27 Porównanie zdolności do degradowania mucyny jelitowej przez florę bakteryjną adherującą do błony śluzowej jelita u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.



Rycina 28 Porównanie zdolności do degradowania mucyny jelitowej przez florę bakteryjną III frakcji kału u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.

W wyniku przeprowadzonych badań zdolności flory bakteryjnej pochodzenia jelitowego do degradowania mucyny jelitowej, stwierdzono że:

- w przypadku flory bakteryjnej zaadherowanej do błony śluzowej jelita, stopień degradacji mucyny był wyższy dla flory pochodzącej z miejsca zmienionego zapalnie w porównaniu do miejsca makroskopowo prawidłowego, jak i grupy kontrolnej (rycina 26 i 27).
- istotne statystycznie różnice w stopniu degradacji mucyny wykazano jedynie dla flory bakteryjnej przywartej do błony śluzowej jelita u chorych na UC. Znamienność statystyczna wynosiła, $p = 0,045$ (test U Manna i Whitney) dla różnicy pomiędzy miejscem zmienionym zapalnie a grupą kontrolną, oraz $p = 0,043$ (test U Manna i Whitney) dla różnicy między miejscem zmienionym zapalnie, a prawidłowym u chorych UC.
- w przypadku flory bakteryjnej III frakcji kału, zaobserwowano, że jedynie w grupie chorych z UC występuje zdolność do degradowania mucyny większa niż w grupie kontrolnej, jednak uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie (rycina 28).

6 DYSKUSJA

Przewlekłe stany zapalne jelit są schorzeniami o niewyjaśnionej etiologii. Zwiększająca się zapadalność na nie (także w Polsce) (Lakatos L. and Lakatos P. L., 2006; Lindberg E. et al., 2000; Wiercinska-Drapalo A. et al., 2005; Karolewska-Bochenek K., 2004) skłania do podjęcia intensywnych prób wyjaśnienia patogenezы IBD. Postulowane są trzy główne czynniki predysponujące do zachorowania na IBD (w tym na CD i UC): patologiczna reakcja systemu GALT na składniki jelitowej flory bakteryjnej; wystąpienie jednej lub większej liczby mutacji w genach odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy w jelicie oraz zaburzenie równowagi ekologicznej w zakresie składu flory bakteryjnej przewodu pokarmowego.

Jak dotąd zdecydowana większość prac badawczych w tej dziedzinie dotyczyła chorych dorosłych, u których proces chorobowy toczył się od wielu lat, a stosowane leczenie najprawdopodobniej doprowadziło do modyfikacji składu flory bakteryjnej. Z tego powodu zasadnym wydawało się przeprowadzenie badania stanu i składu mikroflory jelit u dzieci z IBD, u których do minimum zmniejszone jest ryzyko powstania zaburzeń w ekosystemie jelitowym, wywołanych procesem terapeutycznym.

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia zmian, jakie zachodzą w jelitowej florze bakteryjnej u dzieci cierpiących na chorobę Leśniowskiego – Crohna oraz na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, a także ich wpływu na sekrecję i degradację śluzu jelitowego.

6.1 Flora bakteryjna jelitowej błony śluzowej.

Przebadano próbki tkanki jelitowej, pochodzące z miejsc makroskopowo prawidłowych oraz zmienionych zapalnie pod kątem ilościowych i jakościowych zmian w zakresie bakterii zaadherowanych do błony śluzowej będącej pod wpływem procesu zapalnego.

W wyniku zastosowania metody ilościowego posiewu mikrobiologicznego próbek pobranych z miejsc zmienionych zapalnie stwierdzono, że w grupie pacjentów z CD dominowały bakterie z rodzaju *Streptococcus* (78,5%), natomiast w grupie pacjentów z UC przeważały bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (89,85%), zaś populacja *Bifidobacterium* nie przekraczała 5% w obu tych grupach. W grupie kontrolnej natomiast odsetek *Streptococcus* i *Lactobacillus* był znikomy i wynosił odpowiednio 3,0% i 5,7%, za to dominowały bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (78,9%) (rycina 2). Zmniejszenie stopnia kolonizacji błony śluzowej jelita przez *Bifidobacterium* było wielokrotnie opisywane w literaturze naukowej (Mylonaki M. et al., 2005; Gueimonde M. et al., 2007). Natomiast pojawiają się doniesienia wskazujące na wzrost liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *E. coli*, kolonizujących błonę śluzową pacjentów z IBD (Marteau P. et al., 2004; Neut C. et al., 2002; Kleessen B. et al., 2002), jednakże nie znalazło to potwierdzenia w przeprowadzonych badaniach. Odsetek bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w grupach CD, UC i w grupie kontrolnej wynosił odpowiednio: 13,3%, 0,5% i 11,0%. Zaskakująco przedstawiał się także fakt znacznego wzrostu liczby *Lactobacillus* u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Niektóre bakterie należące do tego rodzaju zalicza się do szczepów wywierających działanie probiotyczne, a więc prozdrowotne. Nie należy jednak zapominać, iż rodzaj *Lactobacillus* to olbrzymia grupa bakterii, obejmująca wiele gatunków o często skrajnie odmiennych wymaganiach życiowych. Niewykluczone zatem, że proces zapalny utrzymujący się w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci, promuje w jakiś sposób zwiększenie się populacji pewnych gatunków laseczek kwasu mlekowego. W niniejszej pracy oceniano jedynie

w sposób ilościowy obecność tych drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym, pomijając ich identyfikację gatunkową, co przekraczało założenia tej pracy.

Analogiczną analizę przeprowadzono dla tkanek pobranych z miejsc niezmiennych chorobowo w jelicie grubym dzieci z IBD. Pokazała ona że, udziały bakterii w badanych grupach wykazywały wysokie podobieństwo w zakresie zawartości mikroorganizmów należących do tych samych grup taksonomicznych. Zarówno u pacjentów z IBD jak i w grupie kontrolnej dominowały bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, których odsetek oscylował w przedziale od 60,6% u dzieci z CD do 82,4% u dzieci z UC (rycina 3). Można zatem stwierdzić, że w miejscach objętych procesem zapalnym skład flory bakteryjnej różnił się znacznie od tej która kolonizowała miejsca nie zmienione zapalnie oraz zaadherowanej do śluzówki jelitowej dzieci nie chorujących na IBD. Ponadto wykazano, że opisane wyżej zróżnicowanie składu mikroflory miało charakter ilościowy, a nie jakościowy, na co wskazywały rezultaty uzyskane dzięki zastosowaniu metody DGGE. Analiza bakteryjnego DNA wyizolowanego z miejsc zmienionych zapalnie jak i makroskopowo prawidłowych pokazała wysokie podobieństwo gatunkowej bioróżnorodności bakterii u tych samych pacjentów, jak i duże zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi dziećmi, co znajduje potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych przez innych badaczy (Green G. L. et al., 2006; Bibiloni R. et al., 2006).

Równolegle do posiewu bakteriologicznego, przeprowadzano badania przy zastosowaniu metody FISH. Niestety, nie udało się wykazać obecności bakterii w próbkach tkanki jelitowej w postaci skrawków histologicznych, ani w homogenatach tkanek (ryciny 4 i 5). Przyczyną braku widocznych komórek bakteryjnych w preparatach mikroskopowych jest ograniczona czułość metody FISH rozpoczynająca się od ok. 10^3 cfu/ml (Amann R. I. et al., 1995; Trebesius K. et al., 1998). Tak niewielka liczba komórek bakteryjnych adherujących do błony śluzowej jelita, prawdopodobnie była następstwem procedury poprzedzającej badanie kolonoskopowe pacjenta, wskutek której zostały one wypłukane z przewodu pokarmowego. Aby wyeliminować ten problem, można wykorzystać w badaniu FISH próbki tkanki jelitowej uzyskane w trakcie chirurgicznego usunięcia fragmentu jelita (Gueimonde M. et al., 2007; Romero C. et al., 2005), jednak taka interwencja jest możliwa jedynie przy rozległych zmianach patologicznych w zaawansowanym stadium choroby.

Przedstawione wyniki pozwalają na przyjęcie tezy, iż w jelicie objętym procesem chorobowym zmiany patologiczne nie miały charakteru ciągłego, co znalazło swoje odzwierciedlenie w zmianach składu ilościowego bakterii w zakresie poszczególnych grup taksonomicznych, głównie *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oraz *Streptococcus*. Potwierdza to znaczenie flory bakteryjnej w procesie zapalnym, w przebiegu IBD w dystalnym odcinku przewodu pokarmowego. Nie można jednak ustalić, czy opisane jej zróżnicowanie było jednym z czynników inicjujących patogenezę, czy też może odgrywało rolę podtrzymującą zapalenie.

6.2 Kałowa flora bakteryjna.

Oprócz tkanki jelitowej, analizie bakteriologicznej poddano także próbki kału pobrane od tych samych pacjentów, od których pochodziły próbki tkanek. W celu przeprowadzenia dokładnego badania flory bakteryjnej zasiedlającej jelito grube, przeanalizowano trzy frakcje kału, uzyskiwane kolejno w trakcie przygotowywania pacjenta do badania z użyciem kolonoskopu. Pierwsza frakcja (wlew doodbytniczy soli fizjologicznej) pochodziła z centralnej części światła jelita i zawierała głównie florę planktonową. Druga frakcja (środek przeczyszczający Phospho-Laxative), to treść jelitowa rozmieszczona bliżej ściany światła jelita i zawierająca bakterie zarówno flory przejściowej, jak i kolonizujące jelito. Trzecia frakcja (kolejny wlew soli fizjologicznej) to treść jelitowa, która bezpośrednio stykała się z błoną śluzową jelita, na której dominowały bakterie kolonizujące tę błonę.

6.2.1 Metoda posiewu bakteriologicznego.

Największe różnice zaznaczały się w rozkładzie odsetkowym bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Podobnie jak w przypadku tkanek, odsetek tych bakterii spadał we wszystkich badanych frakcjach masy kałowej u chorych z IBD (ryciny 6 – 8). Ponadto, zaobserwowano, że u pacjentów z grupy badanej

następował sukcesywny spadek odsetka *Bifidobacterium* w kolejnych frakcjach kału, a tendencja ta rozciągała się na tkanki objęte procesem zapalnym, osiągając poziom zaledwie kilku procent. W grupie kontrolnej bakterie te dominowały, utrzymując swoją liczebność powyżej 90% we wszystkich frakcjach. U pacjentów chorych na CD, w III frakcji pojawiły się w dużej liczbie bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* (31,5%) (rycina 8), pomimo że w poprzedzających frakcjach ten odsetek oscylował w granicach 1%. Również u dzieci cierpiących na UC wykazano obecność *Enterobacteriaceae* i to we wszystkich frakcjach kału, jednak ich odsetek spadał poczynając od 25% w I frakcji i kończąc na 17,9% w frakcji III (ryciny 6 – 8). W grupie kontrolnej wszystkich trzech frakcji odsetek ten nie przekraczał 1%. Zwiększanie się frakcji bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w kale u chorych na IBD zostało potwierdzone doniesieniami innych autorów (Marteau P. et al., 2004; Mylonaki M. et al., 2005). Głównie postuluje się prozapalne działanie bakteryjnego LPSu, uwalnianego przez bakterie Gram – ujemne, ale także zwiększenie się liczby szczepów AIEC (ang. adherent-invasive *Escherichia coli*) adherujących do nabłonka jelitowego i mających zdolność do produkcji hemolizyn degradujących ten nabłonek (Darfeuille-Michaud A. et al., 1998). Sasaki i wsp. oraz Darfeuille i wsp. Wykazali, że szczepy AIEC występują z większą częstością u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, niż u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz zdrowych (Sasaki M. et al., 2007; Darfeuille-Michaud A. et al., 2004). Ma to być może odzwierciedlenie w zwiększającym się odsetku *Enterobacteriaceae* w III frakcji kału u chorych na CD, co wykazano w przeprowadzonych badaniach.

Generalnie, w grupie kontrolnej pacjentów, w kolejnych frakcjach kału, zaobserwowano bardzo wysoką homogenność udziałów bakterii z poszczególnych grup taksonomicznych. W grupach CD i UC natomiast, zaznaczała się tendencja do zmiany udziałów poszczególnych grup bakterii, zbliżając się stopniowo do poziomów oznaczonych w tkance jelitowej. Można zatem przyjąć, iż rozkład flory bakteryjnej w jelicie jest warstwowy, co zostało określone przez Swidsinskiego i wsp. mianem biostruktury flory jelitowej (Swidsinski A. et al., 2008). Im bliżej błony śluzowej jest zlokalizowana warstwa (frakcja) treści jelitowej, tym lepiej oddaje skład flory bakteryjnej przywartej do nabłonka jelitowego, a zatem może mieć większe znaczenie diagnostyczne dla patogenezы i przebiegu IBD (Swidsinski A. et al., 2008).

6.2.2 Metoda FISH.

W I frakcji masy kałowej udziały bakterii w obrębie badanych grup taksonomicznych u dzieci chorych na CD i UC oraz w grupie kontrolnej, wykazywały wysokie podobieństwo. Świadczy to o tym, że flora planktonowa jelita nie ma znaczenia w przebiegu IBD, zważywszy na jej krótki czas pasażu oraz podobieństwo do flory dzieci nie chorujących na IBD.

Podobnie, jak to wykazano dla tkanki jelitowej oraz kału, przebadanych za pomocą metody posiewu, a także stosując metodę FISH, potwierdzono zmniejszenie się udziału bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* u chorych z IBD w III frakcji kału w porównaniu do grupy kontrolnej pacjentów (CD 47,6%, UC 27,4%, kontrola 79,4%). Fakt ten wskazuje na istotną rolę bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w utrzymaniu homeostazy ekologicznej w jelicie grubym u dzieci. Drobnoustroje te, obok pałeczek kwasu mlekowego, wymieniane są jako rezerwuar szczepów o potencjale probiotycznym, zatem pojawia się możliwość sprawdzenia i wykorzystania ich właściwości w terapii IBD (Mach T., 2006; Kim N. et al., 2007). We wszystkich badanych frakcjach kału zaobserwowano nieznaczne zwiększenie się udziału bakterii z gatunku *E. coli* u dzieci cierpiących na chorobę Leśniowskiego – Crohna w stosunku do kontroli, jednak największą różnicę (8%) stwierdzono w III frakcji kału. Udział *Enterobacteriaceae* w tej frakcji, w porównaniu do kontroli, wykazany za pomocą posiewu, był znacznie większy i wynosił ok. 31%. Jednak w FISH użyto sondy ECOLI specyficznej jedynie dla *E. coli*, co uniemożliwiło detekcję pozostałych gatunków bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, a to prawdopodobnie wpłynęło na wykazanie niższego odsetka udziału tej grupy.

Niektórzy badacze opisują zwiększanie się populacji bakterii z rodzaju *Bacteroides* we florze kałowej oraz przylegającej do błony śluzowej pacjentów z IBD (Gophna U. et al., 2006; Lucke K. et al., 2006). W badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy potwierdzono tę prawidłowość dla próbek kału badanych przy pomocy metody FISH. U chorych z UC wykazano zwiększanie się puli *Bacteroides* w miarę przechodzenia do kolejnych frakcji kału w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, gdzie zależność ta została odwrócona. Zwiększona kolonizacja jelita przez *Bacteroides* w IBD mogła być następstwem

zajmowania niszy ekologicznej zwolnionej przez inne bakterie beztlenowe, występujące w przewodzie pokarmowym u dzieci bez IBD, np. przez *Bifidobacterium*. W konsekwencji zwiększona koncentracja endotoksyn *Bacteroides*, może podobnie jak w przypadku *Enterobacteriaceae* prowadzić do zwiększenia aktywności GALT i zaostrzenia stanu zapalnego.

Opisane powyżej zróżnicowanie struktury mikroflory jelitowej miało charakter ilościowy, a nie jakościowy, czego dowiodły wyniki analizy żeli uzyskanych po elektroforezie DGGE. Przebadano całkowite DNA wyizolowane z próbek kału pochodzących od dzieci chorych na CD, UC i z grupy kontrolnej we wszystkich trzech frakcjach kału. Na podstawie analizy uzyskanych dendrogramów, stwierdzono brak istotnych różnic w zakresie jakościowego składu gatunkowego bakterii w próbkach w grupach CD, jak i UC oraz w grupie kontrolnej. Wynika stąd, że podobnie, jak to miało miejsce w przypadku błony śluzowej, zmiany struktury flory bakteryjnej miały charakter ilościowy, a nie jakościowy. Co więcej, można na tej podstawie stwierdzić, że bioróżnorodność bakterii jest zindywidualizowana u każdego badanego pacjenta.

6.3 Relacje pomiędzy beztlenową a tlenową florą bakteryjną.

Oprócz jakościowej oraz ilościowej oceny jelitowej flory bakteryjnej u dzieci z IBD i z grupy kontrolnej przy użyciu metod posiewu oraz FISH, przeprowadzono także analizę porównawczą udziału bakterii tlenowych i beztlenowych. W tym celu zsumowano udziały wszystkich bakterii tlenowych i beztlenowych, osobno w każdej frakcji kału oraz dla próbek tkanki pochodzącej z miejsca zmienionego zapalnie, jak i niezmienionego chorobowo, u chorych na CD, UC i w grupie kontrolnej.

Globalny odsetek tlenowców w tkance pochodzącej z miejsca zmienionego zapalnie w jelicie grubym dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna wynosił 94,6% natomiast w grupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego 92,6%. Świadczy to o olbrzymiej przewadze drobnoustrojów tlenowych w całkowitej puli bakterii kolonizujących pola błony śluzowej objętej procesem zapalnym w przebiegu IBD

u dzieci, co znalazło potwierdzenie w badaniach Conte i wsp. (Conte M.P. et al., 2006). W przypadku próbek tkanki pobranej z miejsc makroskopowo prawidłowych, a więc niezmiennych zapalnie, stwierdzono niemal całkowite odwrócenie proporcji udziałów tlenowców i beztlenowców. W grupie z CD odsetek bakterii tlenowych wyniósł 39%, natomiast z UC 17,5%, a więc bardzo podobnie jak w grupie pacjentów bez IBD, w której ich udział stanowił 20,1%. Uzyskane wyniki dowodzą, że toczący się stan zapalny w jelicie grubym, powoduje znaczne ograniczenie populacji bakterii beztlenowych, będących w prawidłowo funkcjonującym przewodzie pokarmowym w zdecydowanej przewodzie w okrężnicy. Ponadto należy stwierdzić, zresztą podobnie, jak to uczyniono wyżej, podczas analizy wyników posiewu tkanek, że zmiany zapalne w przewodzie pokarmowym u dzieci chorujących na przewlekłe stany zapalne jelit, miały charakter nieciągły, czego dowodzi zróżnicowanie morfologiczne śluzówki oraz różnice w składzie jakościowym bakterii.

W próbkach kału badanych za pomocą metody posiewu bakteriologicznego, zaobserwowano zwiększanie się udziałów tlenowców w grupach CD i UC w miarę przechodzenia do kolejnych frakcji kału; w III frakcji ich odsetki wynosiły odpowiednio 56,6% i 77,8%. W grupie kontrolnej zdecydowanie przeważały beztlenowce, a ich udział był niemal stały, niezależnie od frakcji i wynosił ok. 95%. Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku porównania ilościowego składu flory bakteryjnej w kale przy zastosowaniu metody posiewu, również tutaj okazało się, iż w I frakcji można było zaobserwować największe podobieństwo pomiędzy grupami CD, UC i grupą kontrolną. Dowodzi to, że w I frakcji kału dominuje flora planktonowa, która nie ma znaczenia w przebiegu IBD.

W wyniku przebadania próbek kału za pomocą metody FISH uzyskano rezultaty odbiegające ilościowo od tych otrzymanych dzięki zastosowaniu metody posiewu, jednak potwierdzono tendencję do zwiększania się udziału tlenowców w kolejnych frakcjach kału w grupach CD i UC. U dzieci z CD w I frakcji odsetek tlenowców wynosił 13,5% i zwiększył się do 27,1% w III frakcji, zaś u dzieci z UC w I i w III frakcji udział bakterii tlenowych wynosił 15%. W grupie kontrolnej proporcja tych drobnoustrojów zmniejszyła się z 17,8% w I frakcji kału do 4,7% w frakcji III. Stosując metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ wykazano o wiele wyższe udziały bakterii beztlenowych w badanych próbkach kału niż to wynikało z rezultatów otrzymanych dzięki zastosowaniu ilościowego posiewu

bakteriologicznego. Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż FISH pozwala na detekcję wszystkich komórek bakteryjnych, zarówno żywych, jak i martwych lub uszkodzonych, pozbawionych zdolności do podziału, a zatem nie dających się hodować. Powoduje to, że metody hodowlane dostarczają danych zaniżonych w stosunku do metod opartych na detekcji kwasów nukleinowych, jaką jest bez wątpienia FISH. Ponadto, podczas badania FISH wykorzystano sondy specyficzne dla następujących beztlenowców: *Clostridium coccooides* (sonda Erec482), *Bifidobacterium sp.* (sonda Bif164) i dla *Bacteroides sp.* (sonda Bac303). W posiewie bakteriologicznym udziały *Bacteroides* i *Clostridium* były znikome, co mogło wynikać albo z faktu iż komórki te były uszkodzane jeszcze w przewodzie pokarmowym przez czynniki immunologiczne, albo ulegały toksycznemu działaniu tlenu atmosferycznego podczas pobierania próbek kału i ich transportu do pracowni mikrobiologicznej. Mimo tego, zarówno wyniki uzyskane dzięki metodzie posiewu jak i FISH wskazują na to, że w jelicie grubym w przebiegu IBD wzrastała ogólna pula bakterii tlenowych w stosunku do beztlenowych (Ott S. J. et al., 2004). Ta zmiana jest prawdopodobnie spowodowana rozwijającym się stanem zapalnym, w którym aktywność komórek układu immunologicznego (głównie makrofagów) wzrasta, i dochodzi do powstania zjawiska tzw. wybuchu tlenowego, w skutek którego lokalnie, na krótko, wzrasta stężenie aktywnych form tlenu, tzw. wolnych rodników tlenowych (Rugtveit J. et al., 1995). Bakterie beztlenowe są bardzo wrażliwe na działanie tlenu cząsteczkowego (O₂), natomiast kontakt z jego formami o zwiększonej reaktywności najprawdopodobniej prowadzi do natychmiastowej ich śmierci. Zmniejszenie się populacji beztlenowców, oraz zmiana warunków ekologicznych w jelicie, powoduje że namnażają się bakterie tlenowe.

6.4 Śluz jelitowy a flora bakteryjna.

Podstawowym zadaniem śluzu jelitowego jest zabezpieczenie nabłonka jelitowego przed bezpośrednim kontaktem z florą bakteryjną. Poza tym, z uwagi na swoje właściwości fizyko – chemiczne, śluz ułatwia pasaż treści pokarmowej w świetle jelit. W badaniach stanowiących część tej pracy, sprawdzono grubość warstwy śluzowej pokrywającej ścianę jelita grubego od strony jego światła u dzieci cierpiących na CD, UC oraz w grupie kontrolnej. W tym celu wykorzystano skrawki histologiczne tkanek jelitowych, pochodzące dokładnie z tych samych miejsc, z których pobrano próbki tkanki do badań mikrobiologicznych. Pomiar grubości warstwy śluzu przeprowadzono przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego, po uprzednim wybarwieniu preparatu lektyną MAA znakowaną fluoresceiną. Dodatkowo sprawdzono zdolność globalnej flory bakteryjnej adherującej do nabłonka jelitowego oraz flory bakteryjnej III frakcji kału do degradowania mucyny pochodzącej z przewodu pokarmowego.

W wyniku przeprowadzonych pomiarów grubości warstwy śluzu w okrężnicy, wykazano, że w grupach CD i UC, w miejscach zmienionych zapalnie, jest ona ok. trzykrotnie cieńsza w porównaniu do tej w grupie kontrolnej. Podobne rezultaty uzyskano dokonując porównania pomiędzy miejscem zmienionym zapalnie, a makroskopowo prawidłowym, w grupach pacjentów z CD i UC. Natomiast wykazano, iż warstwa śluzowa w miejscach niezmienionych zapalnie u chorych jest tylko nieznacznie cieńsza niż w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że zmiany w błonie śluzowej w obu formach IBD nie obejmują całej długości jelita grubego, a jedynie jego fragmenty. Miejsca makroskopowo morfologicznie zmienione są bardziej narażone na ekspozycję na florę jelitową, z uwagi na cieńszą, ochroną warstwę śluzu. Przeprowadzone badania wykazały, że błona śluzowa jelita zmieniona zapalnie jest kolonizowana przez florę bakteryjną o zupełnie innym składzie ilościowym, niż ta bytująca na błonie niezmienionej chorobowo, zatem, być może zmieniony skład flory mógł przyspieszać tempo degradacji śluzu. Aby to wyjaśnić, przeprowadzono badanie *in vitro* degradacji mucyny, która jest kluczowym składnikiem śluzu. Uzyskane wyniki pokazują, iż flora przywarta do błony śluzowej w miejscu zmienionym zapalnie degradowała

mucynę w większym stopniu, niż ta zaadherowana do miejsc makroskopowo prawidłowych i w grupie kontrolnej, jednak istotność statystyczna została wykazana jedynie dla tkanek pochodzących od dzieci chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Analogiczne badanie przeprowadzono dla flory kałowej III frakcji kału, jako tej, która ma bezpośredni kontakt z błoną śluzową. Uzyskane wyniki wskazują, że jedynie w grupie UC zdolność do degradowania mucyny była większa niż w grupie kontrolnej, jednak nie potwierdzono ich statystycznej istotności. Otrzymane rezultaty pozwalają sądzić, iż jelitowa flora bakteryjna przywarta do błony śluzowej, w miejscach zmienionych zapalnie może wpływać na tempo zaniku warstwy śluzu jelitowego w okrężnicy, w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, co zostało potwierdzone eksperymentalnie oraz analizą statystyczną. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego – Crohna, co prawda wykazano zmniejszenie się grubości warstwy śluzowej w jelicie, ale zwiększona zdolność do rozkładu mucyny nie była statystycznie znamienne. Można zatem przypuszczać, że odgrywały tutaj rolę inne czynniki wpływające na zmniejszoną sekrecję mucyny, albo na zwiększone tempo jej degradacji, jak np. mutacje w genach *MUC*, które kodują mucyny, lub obniżenie stopnia ekspresji tych genów (Buisine M. P. et al., 2001; Buisine M. P. et al., 1999). Ardesjö i wsp. wykazali że u 84% pacjentów chorujących na CD dochodzi do autoimmunologicznej reakcji przeciwko komórkom kubkowym, zlokalizowanym w nabłonku jelita i odpowiedzialnym za produkcję i sekrecję śluzu jelitowego, co może także skutkować zanikiem warstwy śluzowej (Ardesjö B. et al., 2008). Oczywiście w przypadku UC nie można także wykluczyć wpływu innych, poza florą bakteryjną czynników wpływających na zanik bariery śluzowej, jak np. mutacji genów *MUC* na co wskazują Myerscough i wsp. (Myerscough N. et al., 1995). Flora kałowa III frakcji pochodząca od dzieci cierpiących na UC powodowała degradację mucyny większą niż w grupie kontrolnej, jednakże różnica ta nie była statystycznie istotna, zatem prawdopodobnie ta flora nie ma wpływu na stan śluzu jelitowego.

6.5 Podsumowanie.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono badania nad florą bakteryjną jelita grubego u dzieci cierpiących na przewlekłe stany zapalne jelit: na chorobę Leśniowskiego – Crohna oraz na wrzodziejące zapalenie jelita grubego.

Analiza uzyskanych wyników pozwala sądzić, że opisane zmiany składu flory bakteryjnej jelita mają swój udział w patogenezie IBD. Opisane zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi badanymi frakcjami kału wykazało duże podobieństwo III frakcji kału, czyli kontaktującej się bezpośrednio z błoną śluzową do składu flory bakteryjnej, która ją kolonizuje. Może się to stać podstawą do diagnostyki i monitorowania przebiegu IBD bez konieczności stosowania inwazyjnej biopsji tkanki jelitowej. Ponadto wykazano, że w IBD znacznie zmniejsza się udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, jako składnika flory jelitowej zarówno przywartej do śluzówki jelita grubego, jak kałowej. Fakt ten może być punktem wyjścia do opracowania terapii probiotycznej przewlekłych stanów zapalnych jelit u dzieci, która być może przyczyni się do złagodzenia wystąpienia objawów IBD lub uzyskania wydłużenia okresów remisji choroby.

7 WNIOSKI

1. Miejsca zmienione zapalnie zlokalizowane w okrężnicy objętej procesem chorobowym w przebiegu IBD, są kolonizowane przez florę bakteryjną o odmiennym składzie ilościowym niż ta która bytuje w miejscach niezmienionych zapalnie oraz na śluzówce jelita grubego u dzieci bez IBD.
2. W przebiegu IBD występują odsetkowe zmiany we florze treści jelitowej oraz przywartej do błony śluzowej w porównaniu do grupy dzieci bez IBD. Te zmiany zaznaczają się głównie w zmniejszeniu odsetka bakterii beztlenowych, a zwłaszcza bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium*, a także wzrostem udziału *Streptococcus* w miejscach zmienionych zapalnie, w tkance, w przebiegu CD. Poza tym, zwiększa się populacja *Lactobacillus* w miejscach zmienionych zapalnie, w przebiegu UC oraz wzrasta udział *Enterobacteriaceae*, w tym *E. coli*, we florze kałowej u dzieci chorych na chorobę Leśniowskiego – Crohna.
3. Flora jelitowa w okrężnicy ma strukturę warstwową, tzw. biostrukturę, co oznacza że można wyróżnić florę przejściową oraz florę która kontaktuje się bezpośrednio ze śluzem pokrywającym nabłonek jelita grubego i wywiera na niego wpływ.
4. W obu badanych formach IBD u dzieci występuje zmniejszenie grubości ochronnej warstwy śluzowej okrężnicy, ale tylko w obszarach ściany jelita grubego objętych procesem zapalnym, w pozostałych miejscach warstwa ta zachowuje miąższość taką, jaka występuje w grupie bez IBD.
5. Na ścienienie tej warstwy wpływa flora bakteryjna przywarta do błony śluzowej w miejscach objętych procesem zapalnym w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

8 STRESZCZENIE

Przewlekłe stany zapalne jelit są schorzeniami chronicznymi. Pierwsze opisy tego schorzenia pochodzą już z XVIII wieku, jednak do dziś nie udało się odkryć jego mechanizmu patogenezy. W ostatnich latach zintensyfikowano badania nad tym problemem, z powodu zwiększającej się zapadalności na IBD. Zdecydowana większość prac poświęcona jest chorym dorosłym, u których proces chorobowy toczy się od wielu lat. Jednak stosowana długotrwałe terapia oraz zmiany wywołane biologicznym starzeniem się tkanek, mogą utrudniać interpretację wyników prowadzonych badań. U dzieci bardzo często mamy do czynienia z wczesnymi stadiami choroby, kiedy to do minimum zmniejszony jest wpływ czynników mogących interferować z właściwymi zmianami patologicznymi.

Praca miała za zadanie odpowiedzieć na pytanie dotyczące ilościowego oraz jakościowego składu flory bakteryjnej jelita grubego dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC). Ponadto poddano ocenie grubość warstwy śluzowej pokrywającej ścianę światła jelita pacjentów, a także zbadano wpływ bakteryjnej flory jelitowej na stopień degradacji mucyny *in vitro*. Badaniem objęto 61 dzieci w wieku od 1 do 18 roku. Grupę badaną stanowiło 34 pacjentów (22 z CD i 12 z UC). W grupie kontrolnej było 27 pacjentów.

Do badania użyto próbek tkanki jelitowej oraz próbek kału kolejnych trzech frakcji, uzyskiwanych podczas przygotowywania pacjentów do badania przy pomocy kolonoskopu. U dzieci z grupy badanej wycinki tkanki pobierane były z miejsca makroskopowo prawidłowego oraz zmienionego zapalnie, natomiast u dzieci z grupy kontrolnej wycinki pobierano z jednego miejsca. Badania mikrobiologiczne próbek przeprowadzono przy użyciu metod ilościowego posiewu mikrobiologicznego oraz ilościowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Śluz jelitowy badano za pomocą metody mikroskopii fluorescencyjnej oraz płytkową metodą hodowlaną. Dodatkowo przeprowadzono badanie składu gatunkowego bakterii przy użyciu metody elektroforezy w gradiencie denaturującym podwójną helisę DNA (DGGE).

Stwierdzono, że w przebiegu IBD zmienił się skład ilościowy bakterii. W grupie z IBD spadła ilość *Bifidobacterium*. U pacjentów z CD wzrósł odsetek *Streptococcus*, a z UC zwiększyła się ilość *Lactobacillus*. Zaobserwowano, że we florze dzieci chorujących na IBD dominują bakterie tlenowe. Zmiany w składzie bakterii miały charakter ilościowy, a nie jakościowy, co wykazano za pomocą DGGE. Ponadto, wykazano zmniejszenie się grubości warstwy śluzu jelitowego u pacjentów z IBD w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, wykazano, że flora jelitowa pacjentów w grupie chorych na UC miała większą zdolność do degradowania mucyny in vitro niż to miało miejsce w grupie kontrolnej.

9 SUMMARY

Inflammatory bowel diseases are chronic disorders with inflammatory background. First description of IBD origins from XVIII century, unfortunately we still do not know much of its aetiology. In the recent years research on this problem has intensified because of increasing incidence of IBD. The majority of studies are devoted to adults with IBD with pathological processes present for many years. However, applied long-term therapy and changes triggered in the tissues by the biological ageing processes may make interpretations of results difficult. In children we can observe very often early stages of disease when the risk of interference with other factors is minimal.

The aim of the study was to compare numbers of bacteria in colon samples of children suffering from IBD and controls. The study group consisted of 61 patients, 1–18 years of age: 12 with ulcerative colitis, 22 with Crohn's disease. Control group consisted of 27 patients without IBD. The samples taken were: 2 biopsies collected during colonoscopy from both macroscopically normal or inflamed mucosa (normal one only in the control group) and stool collected in three fractions during preparation to colonoscopy. Tissue samples and stool were examined using a quantitative culture technique, a quantitative fluorescent in situ hybridization (FISH) method and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Moreover, thickness of intestine mucus layer and mucin degradation by bacterial gut flora were checked.

The number of *Bifidobacterium* spp. was lower in all examined stool samples of children with IBD and also lower in tissue samples collected from the macroscopically inflamed mucosa as compared to controls. In case of tissue samples obtained from children with CD, the number of *Streptococcus* spp. was higher and in children with UC, the level of *Lactobacillus* spp. increased, as compared to control tissue samples. Described changes in the composition of the bacterial flora in the colon were of a qualitative character. Faecal flora in patients with IBD was richer in aerobic bacteria than in the control group. Moreover, the inflammatory process taking place in the intestines of children with IBD caused a

thinning of the mucus layer lining the intestinal wall and the faecal flora in patients with UC the had ability do digest mucin in vitro.

10 WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

10.1 Wykaz rycin.

- Rycina 1 Czynniki predysponujące do zachorowania na IBD.
- Rycina 2 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej. $\chi^2=62600000$, $p < 0,0001$
- Rycina 3 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej. $\chi^2=37339797$, $p < 0,0001$
- Rycina 4 FISH z homogenatu tkanki. Powiększenie 1000x. (A) – obraz powstały z nałożenia trzech obrazów B, C i D; (B) – obraz uzyskany z barwienia sondą EUB znakowaną FITC; (C) – obraz uzyskany z sondy ECOLI znakowanej CY3; (D) – obraz uzyskany z barwnika DAPI.
- Rycina 5 FISH ze skrawków tkanki. Powiększenie 1000x. (A) – obraz powstały z nałożenia trzech obrazów B, C i D; (B) – obraz uzyskany z barwienia sondą EUB znakowaną FITC; (C) – obraz uzyskany z sondy ECOLI znakowanej CY3; (D) – obraz uzyskany z barwnika DAPI.
- Rycina 6 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=644910000$, $p < 0,0001$
- Rycina 7 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=2076100000$, $p < 0,0001$

- Rycina 8 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=1305200000$, $p < 0,0001$
- Rycina 9 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=2956200000$, $p < 0,0001$
- Rycina 10 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=3823900000$, $p < 0,0001$
- Rycina 11 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH), $\chi^2=3243900000$, $p < 0,0001$
- Rycina 12 FISH z próbek kału. Powiększenie 1000x. (A) – kombinacja sond EUB+DAPI; (B) – kombinacja sond STREP+EUB; (C) – kombinacja sond ECOLI+DAPI; (D) – kombinacja sond Lab158+DAPI.
- Rycina 13 FISH z próbek kału. Powiększenie 1000x. (E) – kombinacja sond Bif164+EUB; (F) - kombinacja sond BAC303+DAPI; (G) – kombinacja sond Erec+DAPI.
- Rycina 14 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu), $\chi^2=2550000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 15 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z obu form IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=2530000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 16 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=3130000000$, $p < 0,0001$

- Rycina 17 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=243000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 18 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu) $\chi^2=253000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 19 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej I frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=6530000$, $p < 0,0001$
- Rycina 20 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej II frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=23000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 21 Porównanie średniej, procentowej zawartości bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej III frakcji, pobranej od pacjentów z obu form IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH) $\chi^2=453000000$, $p < 0,0001$
- Rycina 22 Stopień podobieństwa składu gatunkowego flory bakteryjnej przywartej do śluzówki jelita dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna i dzieci z grupy kontrolnej (DNA izolowane po hodowli bakterii).
- Rycina 23 Stopień podobieństwa składu gatunkowego flory bakteryjnej III frakcji kału u dzieci z chorobą Leśniowskiego – Crohna, z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i dzieci z grupy kontrolnej (DNA izolowane bezpośrednio z próbek kału).
- Rycina 24 Grubość warstwy śluzu wyścielającej światło jelita. Powiększenie 200x.
(A) – skrawek tkanki z miejsca zmienionego zapalnie u pacjenta z CD;
(B) – skrawek tkanki z miejsca zmienionego zapalnie u pacjenta z UC;
(C) – skrawek pobrany od pacjenta z grupy kontrolnej.

- Rycina 25 Porównanie grubości warstwy śluzu wyścielającej światło jelita u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.
- Rycina 26 Stopień degradacji mucyny jelitowej przez florę bakteryjną adherującą do błony śluzowej jelita. Wokół kolonii widoczna strefa halo, zdegradowanej mucyny. (A) – flora bakteryjna pochodząca z miejsca zmienionego zapalnie od pacjenta z CD; (B) – flora bakteryjna pochodząca z miejsca zmienionego zapalnie od pacjenta z UC; (C) – flora bakteryjna pochodząca od pacjenta z grupy kontrolnej; (D) – kontrola (flora bakteryjna pochodząca od pacjenta z CD, zabita w autoklawie) – brak strefy „halo”.
- Rycina 27 Porównanie zdolności do degradowania mucyny jelitowej przez florę bakteryjną adherującą do błony śluzowej jelita u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.
- Rycina 28 Porównanie zdolności do degradowania mucyny jelitowej przez florę bakteryjną III frakcji kału u pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej.

10.2 Wykaz tabel.

- Tabela 1 Charakterystyka badanych grup pacjentów
- Tabela 2 Zestawienie liczby przebadanych próbek w grupie kontrolnej
- Tabela 3 Zestawienie liczby przebadanych próbek w badanej grupie pacjentów z CD
- Tabela 4 Zestawienie liczby przebadanych próbek w badanej grupie pacjentów z UC
- Tabela 5 Porównanie liczby bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca zmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej.

- Tabela 6 Porównanie liczby bakterii w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca niezmienionego zapalnie i od pacjentów z grupy kontrolnej.
- Tabela 7 Porównanie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)
- Tabela 8 Porównanie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)
- Tabela 9 Porównanie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda posiewu)
- Tabela 10 Zestawienie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej I frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)
- Tabela 11 Zestawienie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej II frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)
- Tabela 12 Zestawienie liczby bakterii w 1 gramie masy kałowej III frakcji pobranej od pacjentów z IBD i od pacjentów z grupy kontrolnej (metoda FISH)
- Tabela 13 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie tkanki jelitowej pobranej od pacjentów z IBD z miejsca zmienionego zapalnie i niezmienionego chorobowo (metoda posiewu).
- Tabela 14 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej, poszczególnych frakcji, pobranych od pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej (metoda posiewu).
- Tabela 15 Porównanie liczby bakterii tlenowych i beztlenowych w 1 gramie masy kałowej, wszystkich trzech frakcji, pobranych od pacjentów z IBD i z grupy kontrolnej (metoda FISH).

10.3 Karty pracy.

Karta pacjenta (wyniki testów biochemicznych)

IBD – ilościowe badanie mikrobiologiczne

Nazwisko Imię

Numer pacjenta

| Bakteria | typ próbki* | IDENTYFIKACJA BAKTERII NA PODSTAWIE ICH WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNYCH | | | | | | | |
|----------|-------------|--|----------|----------------|--------|------|---|-----|------|
| | | podłoże | hemoliza | preparat Grama | Esk.** | NaCl | produkcja H ₂ O ₂ | API | inne |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

UWAGI:

* I; II; III; A lub B

** eskulina

Karta pacjenta

IBD – ilościowe badanie mikrobiologiczne

Nazwisko Imię

Wiek

Numer pacjenta

| Próbka [g] | I ¹ | II ² | III ³ | A ⁴ | B ⁵ |
|------------|----------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|
| posiew | | | | | |
| FISH | | | | | |

masa kału [g]

masa tkanki [g]

Data pobrania próbki

| Grupy bakterii | KAŁ | | | | | | TKANKA | |
|---------------------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|--------|
| | I | | II | | III | | A | B |
| | posiew | FISH | posiew | FISH | posiew | FISH | posiew | posiew |
| <i>Streptococci</i> | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| <i>Enterococci</i> | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| <i>Staphylococci</i> | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| ANAEROBES | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| <u>EUB</u> | | | | | | | | |

UWAGI:

- ¹ pierwsze pobranie kału
- ² drugie pobranie kału
- ³ trzecie pobranie kału
- ⁴ miejsce zmienione zapalnie
- ⁵ miejsce niezmienione zapalnie

11 PIŚMIENICTWO

- ABREU M. T., and SPARROW M. P. 2006. Translational Research in Inflammatory Bowel Disease. *Mt Sinai J Med.* 73:1076-1073.
- AMANN R. I., LUDWIG W., and SCHLEIFER K. H. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol Rev.* 59:143–169.
- ANNESE V., VALVANO M. R., and PALMIERI O. 2006. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 12:3636-3644.
- ARAYA M., MORELLI L., REID G., SANDERS M. E., STANTON C., PINEIRO M., and BEN EMBAREK P. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food., p. 1-11. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, London, Ontario.
- ARDESJÖ B., PORTELA-GOMES G.M., RORSMAN F., GERDIN E., LÖÖF L., GRIMELIUS L., KÄMPE O., and EKWALL O. 2008. Immunoreactivity against goblet cells in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 14:652-661.
- ARNOLD G. L., BEAVES M. R., PRYDUN V. O., and M. W. J. 2002. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 8:10-15.
- AUFSES A. H. 2000. The History of Surgery for Crohn's Disease at The Mount Sinai Hospital. *Mt Sinai J Med.* 67:198-203.
- AUTSCHBACH F., EISOLD S., HINZ U., ZINSER S., LINNEBACHER M., GIESE T., and AT AL. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut.* 54:944-949.
- BACH J. F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 347:911-920.

- BERREBI D., MAUDINAS R., HUGOT J. P., and AT AL. 2003. CARD15 overexpression in inflamed Crohn`s disease colons by mononuclear and epithelial cells. *Gut*. 52:840-846.
- BIBILONI R., MANGOLD M., MADSEN K. L., FEDOAK R. N., and TANNOCK G. W. 2006. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn`s disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol*. 55:1141-1149.
- BORCHERS A. T., KEEN C. L., and GERSHWIN M. E. 2005. Hope for the hygiene hypothesis: when the dirst hits the fan. *J Asthma*. 42:225-247.
- BRAAT H., PEPPELENBOSCH M. P., and HOMMES D. W. 2006. Immunology of Crohn`s Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1075:135-154.
- BRANT S. R., PANHUYSEN C. I. M., NICOLAE D. L., REDDY D. M., BONEN D. K., KARALIUKAS R., and ZHANG R. 2003. *MDR1* Ala893 polymorphism is associated with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Hum Genet*. 73:1282-1292.
- BREESE E., MICHIE C. A., NICHOLLS S. W., MURCH S. H., WILLIAMS C. B., DOMIZIO P., and WALKER-SMITH J. A. 1994. Tumor Necrosis Factor α - Producing Cells in the Intestinal Mucosa of Children with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroeneterology*. 106:1455-1466.
- BUISINE M. P., DESREUMAUX P., LETEURTRE E., COPIN M. C., COLOMBEL J. F., PORCHET N., and AUBERT J. P. 2001. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn`s disease. *Gut*. 49:544-551.
- BUISINE M. P., DESREUMAUX P., LETEURTRE E., DEBAILLEUL V., GAMBIEZ L., GEBOES K., ECTORS N., DELESCAUT M. P., and AT AL. 1999. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 5:24-32.
- CHANDRAN P., SATTHAPORN S., ROBINS A., and EREMIN O. 2003. Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (I). *Surg J R Coll Surg Edinb Irel*. 1:63-75.

- CLARK P. A., COTTON L. N., and MARTIN J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. II. Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult Dairy Prod J.* 28:11-14.
- CONTE M.P., SCHIPPA S., ZAMBONI I., PENTA M., CHIARINI F., SEGANTI L., OSBORN J., FALCONIERI P., BORRELLI O., and CUCCHIARA S. 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 55:1760-1767.
- COSGROVE M., AL-ATIA R., and JENKINS HR. 1996. The epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child.* 74:460-461.
- COTTONE M., ROSSELLI M., ORLANDO A., OLIVA L., PULEO A., CAPPELLO M., and AT AL. 1994. Smoking habits and recurrence in Crohn`s disease. *Gastroenterology.* 106:643-648.
- CROHN B.B., GINZBURG L., and OPPENHEIMER G.D. 1932. Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *J Am Med Ass.* 99:1323-1329.
- CROUCHER P. J. P., MASCHERETTI S., MATHEW C. G., FOELSCH U. R., HAMPE J., and SCHREIBER S. 2003. Lack of association between the C3435T *MDR1* gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations. *Gastroenterology.* 125:1919-1920.
- CROUCHER S. C., HOUSTON A. P., BAYLISS C. E., and TURNER J. R. 1983. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl Environ Microbiol.* 45:1025-1033.
- CUKROWSKA B., and CZARNOWSKA E. 2007. Wpływ probiotyków na układ immunologiczny. *Zakażenia.* 1:59-64.
- DANESE S., and FIOCCHI C. 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 12:4807-4812.
- DANESE S., SANS M., and FIOCCHI C. 2004. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 3:394-400.

- DARFEUILLE-MICHAUD A., BOUDEAU J., BULOIS P., NEUT C., GLASSER A. L., BARNICH N., BRINGER M. A., and AT AL. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 127:412-421.
- DARFEUILLE-MICHAUD A., NEUT C., BARNICH N., LEDERMAN E., DI MARTINO P., DESREUMAUX P., GAMBIEZ L., JOLY B., and AT AL. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 115:1405-1413.
- DAVIDSON N. J., HUDAK S. A., and LESLEY R. E. 1998. IL-12, but not IFN gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol*. 161:3143-3149.
- DE KRUIF P. 1956. Łowcy mikrobów. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa.
- DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA A. 2006. Czy postęp zachodzący w poszukiwaniu przyczyn powstawania choroby Leśniowskiego-Crohna idzie w parze z postępem trerapeutycznym? *Przeegl Gastroenterol*. 1:65-69.
- ECKBURG P. B., BIK E. M., BERNSTEIN C. N., PURDOM E., DETHLEFSEN L., SARGENT M., GILL S. R., NELSON K. E., and RELMAN D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308:1635-1638.
- EKBOM A., DASZAK P., KRAAZ W., and WAKEFIELD A. J. 1996. Crohn's disease after in-utero measles virus exposure. *Lancet*. 348.
- ELSON C. O., CONG Y., MCCRACKEN V. J., DIMMITT R. A., LORENZ R. G., and WEAVER C. T. 2005. Experimental model sof inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 206:260 -276.
- FAUBION W. A., LOFTUS E. V., HARMSSEN W., and AT AL. 2002. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 123:393-395.

- FRANKS A. H., HARMSSEN H. J. M., RAANGS G. C., JANSEN G. J., SCHUT F., and WELLING G.W. 1998. Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol.* 64:3336-3345.
- FREITAS M., AXELSSON L. G., CAYUELA C., MIDTVEDT T., and TRUGNAN G. 2002. Microbial - host interactions specifically control the glycosylation pattern in intestinal mouse mucosa. *Histochem Cell Biol.* 118:149-161.
- FUJINO S., ANDOH A., and BAMA S. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 52:65-70.
- FUSS I. J. 2003. Cytokine Network in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2:101-112.
- GANZ T. 2003. Microbiology: gut defence. *Nature.* 422:478-479.
- GIALLOURAKIS C., STOLL M., MILLER K., HAMPE J., LANDER E. S., DALY M. J., SCHREIBER S., and RIOUX J. D. 2003. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet.* 73:205-211.
- GIONCHETTI P., RIZZELLO F., LAMMERS K. M., MORSELLI C., SOLLAZZI L., DAVIES S., TAMBASCO R., CALABRESE C., and CAMPIERI M. 2006a. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 12:3306-3313.
- GIONCHETTI P., RIZZELLO F., LAMMERS K. M., MORSELLI C., TAMBASCO R., and CAMPIERI M. 2006b. Antimicrobials in the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Digestion.* 73:77-85.
- GOPHNA U., SOMMERFELD K., GOPHNA S., DOOLITTLE W., and VELDHUYZEN VAN ZANTEN S. J. O. 2006. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* 44.

- GREEN G. L., BROSTOFF J., HUDSPITH B., MICHAEL M., MYLONAKI M., RAYMENT N., STAINES N., SANDERSON J., RAMPTON D. S., and BRUCE K. D. 2006. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *J Appl Microbiol.* 100:460-469.
- GROUX H. A., and BIGLER O. M. 1997. A CD4+ T - cells subset inhibits antigen-specific T - cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389:737-742.
- GRYBOSKI J. D. 1994. Crohn's disease in children 10 years old and younger: comparison with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 18:174-182.
- GUEIMONDE M., OUWEHAND A., HUHTINEN H., SALMINEN E., and SALMINEN S. 2007. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 13:3985-3989.
- HARMSSEN H. J. M., GIBSON G. R., ELFFERICH P., RAANGS G. C., WILDEBOER-VELOOA A. C. M., ARGAIZB A., ROBERFROIDC M. B., and WELLING G. W. 2000. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 183:125-129.
- HART A. L., AL-HASSI H. O., RIGBY R. J., BELL S. J., EMMANUEL A. V., KNIGHT S. C., KAMM M. A., and STAGG A. J. 2005. Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 129:50-65.
- HARTLEY C. L., NEUMANN C. S., and RICHMOND M. 1979. Adhesion of commensal bacteria to the large intestine wall in humans. *Infect Immun.* 23:128-132.
- HAUSER W., HOFFMANN J., KUHbacher T., RAIBLE A., REINSHAGEN M., ROGLER G., SCHREIBER S., NEUKAMM U., and ECETERSKI A. 2007. Choroba Leśniowskiego - Crohna i inne nieswoiste zapalenia jelit. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- HILDEBRAND H., FINKEL L., GRAHNQUIST J., LINDHOLM J., EKBOM A., and ASKLING J. 2003. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut.* 52:1432-1434.

- HILL M. J., and DRASAR B. S. 1975. The normal colonic bacterial flora. *Gut*. 16:318-323.
- HSUEH W., GONZALEZ-CRUSSI F., and ARROYAVE J. 1987. Platelet-activating factor: an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. *FASEB J*. 1:403-405.
- HUGOT J. P. 2006. CARD15/NOD2 Mutations in Crohn`s Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1072:9-18.
- HUGOT J. P., CHAMAILLARD M., ZOULI H., and AT AL. 2001. Association o NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn`s disease. *Nature*. 411:559-603.
- HULTEN K., EL-ZIMAITY H. M., KARTTUNEN T. J., ALMASHRAWI A., SCHWARTZ M. R., GRAHAM D. Y., and EL-ZAATARI F. A. 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *Am J Gastroenterol*. 96:1529-1535.
- HUSER W., HOFFMN J., KUHbacher T., RAIBLE A., REINSHAGEN M., ROGLER G., SCHREIBER S., NEUKAMM U., and ECETERSKI A. 2007. Choroba Leśniowskiego - Crohna i inne nieswoiste zapalenia jelit. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- INOHARA N., OGURA Y., FONTALBA A., GUTIERREZ O., PONS F., CRESPO J., FUKASE K., INAMURA S., and AT AL. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implication for Crohn`s disease. *J Biol Chem*. 278:5509-5512.
- JANSEN G. J., MOOIBROEK M., IDEMA J., HARMSSEN H. J. M., WELLING G. W., and DEGENER J. E. 2000. Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *J Clin Microbiol*. 38:814-817.
- JEDYNAK-WĄSOWICZ U., WĘDRYCHOWICZ A., PRZYBYSZEWSKA K., DUPLAGA-KOWALSKA K., FYDEREK K., PIECZARKOWSKI S., SŁADEK M., AL-HUTARI I., and GULA Z. 2005. Epidemiologia zachorowań na wrzodziejące zapalenie jelita

grubego u dzieci z makroregionu południowej Polski: Badanie retrospektywne 1992-2000., p. 43. *In: XXVIII Ogólnopolski Zjazd Pediatrów, Rzeszów, Polska.*

KAPSENBERG M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 3:984-993.

KAROLEWSKA-BOCHENEK K., S. K., GRZYBOWSKA K., RYZKO J., . 2004. Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland: a 2-year prospective study`s preliminary findings., p. 308-309. *In: 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Vol. P0661, Paris, France.*

KAUFMANN H. J., and TAUBIN H. L. 1987. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med.* 107:513-516.

KIM N., KUNISAWA J., KWEON M.N., EOG JI G., and KIYONO H. 2007. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4(+) CD45RB(high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin Immunol.* 123:30-39.

KIRSNER J. B. 1988. Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 10:286-297.

KLEESSEN B., KROESEN A. J., BUHR H. J., and BLAUT M. 2002. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol.* 37:1034-1041.

KOMATSU M., KOBAYASHI D., SAITO K., FURUYA D., YAGIHASHI A., ARAAKE H., TSUJI N., SAKAMAKI S., NIITSU Y., and WATANABE N. 2001. Tumor Necrosis Factor - a in Serum of Patients with Inflammatory Bowel Disease as Measured by a Highly Sensitive Immuno-PCR. *Clin Chem.* 47:1297-1301.

KONTOYIANNIS D., PASPARAKIS M., and PIZARRO T. T. 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements:

- implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. 10:387-398.
- KUGATHASAN S., J. R. H., HOFFMANN R. G., HEIKENEN J., TELETHGA G., . 2003. Epidemiologic and clinical characteristic of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: A statewide population – based study. *J Pediatr*.
- LAKATOS L., and LAKATOS P. L. 2006. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease increasing in Eastern Europe? *Postgrad Med J*. 82:332-337.
- LAKATOS P. 2006. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol*. 12:6102-6108.
- LANGENDIJK P. S., SCHUT F., J. G. J., RAANGS G. C., KAMPHUIS G. R., WILKINSON M. H., and WELLING G. W. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 61:3069-3075.
- LANGHOLZ E., MUNKHOLM P., A. KRASILNIKOFF P., and BINDER V. 1997. Inflammatory bowel diseases with onset in childhood. Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol*.:139-147.
- LEE J. C., BRIDGER S., MCGREGOR C., MACPHERSON A J., and JONES J. E. 1999. Why children with inflammatory bowel disease are diagnosed at a younger age than their affected parent. *Gut*. 44:808-811.
- LEŚNIEWSKI A. 1903. Przyczynek do chirurgii kiszek. *Medycyna*. 31:460-518.
- LEY R. E., PETERSON D. A., and GORDON J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124:837-848.
- LICHTAROWICZ A. M., and MAYBERRY J. F. 1988. Antoni Lesniowski and his contribution to regional enteritis (Crohn`s disease). *Journal of the Royal Society of Medicine*. 81:468-470.

- LINDBERG E., LINDQUIST B., HOLMQUIST L, and HILDEBRAND H. 2000. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30:259-264.
- LOFTUS E. V. 2004. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalance and Environmental Influences. *Gastroenterology.* 126:1504-1517.
- LUCKE K., MIEHLKE S., JACOBS E., and SCHUPPLER M. 2006. Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol.* 55:617-624.
- MACH T. 2006. Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. *J Physiol Pharmacol.* 57:23-33.
- MADSEN K. L., DOYLE J. S., JEWELL L. D., TAVERNINI M. M., and FEDORAK R. N. 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene - deficient mice. *Gastroenterology.* 116:1107-1114.
- MANNON P. J., FUSS I J., and MAYER L. 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn`s disease. *N Engl J Med.* 351:2069-2079.
- MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., VANCANNEYT M., and SCHLEIFER K. H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology.* 142:1097-1106.
- MARTEAU P., LEPAGE P., MANGIN I., SUAU A., DORE J., POCHART P., and SEKSIK P. 2004. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 20 Suppl. 4:18-23.
- MATHEW C. G., and LEWIS C. C. 2004. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet.* 13:161-168.
- MAYER L. 2000. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30:4-12.

- MCCALL R. D., HASKILL S., ZIMMERMANN E. M., LUND P. K., THOMPSON R. C., and SARTOR R. B. 1994. Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology*. 106:960-972.
- METCHNIKOFF E. 1907. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. William Heinemann, London.
- MUSZYŃSKI J. 2001. Nieswoiste zapalenia jelit. *Poradnik lekarza*. 6:22-30.
- MYERSCOUGH N., WARREN B., GOUGH M., and CORFIELD A. 1995. Expression of mucin genes in ulcerative colitis. *Biochem Soc Trans*. 23:536S.
- MYLONAKI M., RAYMENT N.B., RAMPTON D.S., HUDSPITH B.N., and BROSTOFF J. 2005. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 11:481-487.
- NEURATH M. F. 2004. Mucosal immunity in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 10:29-31.
- NEUT C., BULOIS P., DESREUMAUX P., MEMBRÉ J.M., LEDERMAN E., GAMBIEZ L., CORTOT A., QUANDALLE P., VAN KRUININGEN H., and COLOMBEL J.F. 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 97:939-946.
- NOGUCHI M., HIWATASHI N., LIU Z., and TOYOTA T. 1998. Secretion imbalance between tumor necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut*. 43:203-209.
- OGURA Y., BONEN D. K., INOHARA N., and ET AL. 2001a. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411:537-539.
- OGURA Y., INOHARA N., BENITO A., and AT AL. 2001b. Nod2, a Nod1/Afa-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem*. 277:41701-41705.

- ONDERDONK A. B. 2000. Intestinal microflora and inflammatory bowel disease. WB Saunders Co., Philadelphia.
- ONNIE C. M., FISHER S. A., PATTINI R., and AT AL. 2006. Association of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis.* 12:263-271.
- OTT S. J., MUSFELDT M., WENDEROTH D. F., HAMPE J., BRANT O., FOLSCH U. R., TIMMIS K. N., and SCHREIBER S. 2004. Reduction in diversity of colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut.* 53:685-693.
- OWEN R. L., PIERCE N. F., APPLE R. T., and CRAY W. C. 1986. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis.* 153:1108-1118.
- OWEN R. L., PIERCE N. F., APPLE R. T., and CRAY W. C. 1986. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis.* 153:1108-1118.
- PAPADAKIS K. A., and TARGAN S. R. 2000. Role of Cytokines in The Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Med.* 51:289-298.
- PELTEKOVA V. D., WINTLE R. F., RUBIN L. A., AMOS C. I., HUANG Q., GU X., NEWMAN B., VAN OENE M., and CESCO D. 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet.* 5:471-475.
- PORCHET N., and AUBERT J. P. 2004. MUC genes: mucin or not mucin? That is the question. *Med Sci.* 20:569-574.
- PRANTERA C., ZANNONI F., SCRIBANO M. L., BERTO E., ANDREOLI A., KOHN A., and LUZZI C. 1996. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's

disease: a randomized controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol.* 91:328-332.

PULLAN R. D., THOMAS G. A. O., RHODES M., and AT AL. 1994. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut.* 35:353-359.

RAVIKUMARA M., and SANHU B. K. 2006. Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease In Childhood. *Indian J Pediatr.* 73:717-721

RIIS L., VIND I., VERMEIRE S., WOLTERS F., KATSANOS K., POLITI P., FREITAS J., and AT. AL. 2007. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population - based cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis.* 13:24-32.

ROEDIGER W. E., and NANCE S. 1986. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br J Exp Pathol.* 67:773-782.

ROMERO C., HAMDY A., VALENTINE J.F., and NASER S.A. 2005. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis.* 11:116-125.

RUGTVEIT J., HARALDSEN G., HØGÅSEN A.K., BAKKA A., BRANDTZAEG P., and SCOTT H. 1995. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut.* 37:367-373.

SARTOR R. B. 1997. Enteric microflora in IBD: pathogens or commensal? *Inflamm Bowel Dis.* 3:230-235.

SARTOR R. B., CROMARTIE W. J., POWELL D. W., and S. J. H.. 1985. Granulomatous enterocolitis induced in rats by purified bacterial cell wall fragments. *Gastroenterology.* 89:587-595.

- SASAKI M., SITARAMAN S.V., BABBIN B.A., GERNER-SMIDT P., RIBOT E.M., GARRETT N., ALPERN J.A., AKYILDIZ A., THEISS A.L., NUSRAT A., and KLAPPROTH J.M. 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest.* 87:1042-1054.
- SCHWAB M., SCHAEFFELER E., MARX C., FROMM M F., KASKAS B., METZLER J., and STANGE E. 2003. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 124:26-33.
- SIMON G. L., and GORBACH S. L. 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology.* 86:174-193.
- SONNENBURG J. L., ANGENENT L. T., and GORDON J. I. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol.* 5:569-573.
- STRUS M., UHLIG H., POWRIE F., and HECZKO P. B. 2005. A role of bacteria in inflammatory bowel disease evoked in animal models. *Gastroenterologia Polska.* 12:15-20.
- SUTHERLAND L. R., SINGLETON J., SESSIONS J., HANAUER S., KRAWITT E., RANKIN G., and AT AL. 1991. Double - blind placebo - controlled trial of metronidazole in Crohn`s disease. *Gut.* 32:1071-1075.
- SWIDSINSKI A., LOENING-BAUCKE V., VANEECHOUTTE M., and DOERFFEL Y. 2008. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis.* 14:147-161.
- SWIDSINSKI A., WEBER J., LOENING-BAUCKE V., HALE L. P., and LOCHS H. 2005. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Microbiol.* 43:3380-3389.
- ŚLIWIŃSKI Z. K., and STOBIŃSKI M. 2006. Postępy w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit. *Praktyka Medyczna:*62-70.

- TARGAN S. R., HANAUER S. B., and VAN DEVENTER S. J. H. 1997. A short - term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn`s disease. *N Engl J Med.* 337:1029-1035.
- THOMAS G. A., RHODES J., and GREEN J. T. 1998a. Inflammatory bowel disease and smoking - a review. *Am J Gastroenterol.* 93:144-149.
- THOMAS G. A., SWIFT G. L., GREEN J. T., NEWCOMBE R. G., BRANIFF-MATHEWS C., RHODES J., WILKINSON S., and AT AL. 1998b. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut.* 42:497-500.
- THOMPSON-CHAGOYAN O. C., MALDONADO J., and GIL A. 2005. Aetiology if inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associate lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr.* 24:339-352.
- TIMMER A., SUTHERLAND L. R., and MARTIN F. 1998. Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn`s disease. *Gastroenterology.* 114:1143-1150.
- TREBESIU K., HARMSEN D., RAKIN A., SCHMELZ J., and HEESEMANN J. 1998. Development of rRNA-Targeted PCR and In Situ Hybridization with Fluorescently Labelled Oligonucleotides for Detection of Yersinia Species. *J Clin Microbiol.* 36:2557–2564.
- TRINCHIERI G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3:133-146.
- VAN DER SLUIS M., DE KONING B. A., DE BRUIJN A. C., VELCICH A., MEIJERINK J. P., VAN GOUDOEVEER J. B., BULLER H. A., and AT AL. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 131:117-129.
- VAN DER ZAAG-LOONEN H. J., C. M., TAMINIAU J.,. 2004. The incidence of Paediatric inflammatory bowel disease in the Netherlands. *J Paediatr Gstronterol Nutr.* 38:302 – 307.

- VAN LIMBERGEN J., RUSSEL R. K., NIMMO E. R., HO G. T., ARNOTT I. D., WILSON D. C., and SATSANGI J. 2007a. Genetics of the Innate Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 13:338-355.
- VAN LIMBERGEN J., RUSSEL R. K., NIMMO E. R., TORKVIST L., LEES C. W., DRUMMON H. E., SMITH L., ANDERSON N. H., GILLETT P. M., MCGROGAN P., HASSAN K., and AT AL. 2007b. Contribution of the NOD1/CARD4 insertion/deletion polymorphism +32656 to inflammatory bowel disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis.* 6.
- WAKEFIELD A. J., EKBOM A., DHILLON A. P., PITTILO R. M., and POUNDER R. E. 1995. Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology.* 108:911-916.
- WAKEFIELD A. J., PITTILO R. M., SIM R., COSBY S. L., STEPHENSON J. R., DHILLON A. P., and POUNDER R. E. 1993. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol.* 39:345-353.
- WALTER J., T. G.W., TILSALA-TIMISJARVI A., RODTONG S., LOACH D.M., MUNRO K., and ALATOSSAVA T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 66:297-303.
- WATANABE T., KITANI A., MURRAY P. J., and STROBER W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2 - mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol.* 5:800-08.
- WIERCINSKA-DRAPALO A., JAROSZEWICZ J., FLISIAK R., and PROKOPOWICZ D. 2005. Epidemiological characteristic of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol.* 11:2630-2633.
- WINESETT M. 1997. Inflammatory bowel disease in children and adolescents. *Pediatr Ann.* 26:227-234.
- YASUNORI O., BONEN D., and NAOHIRO I. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411:603-606.

YEN D., CHEUNG J., and SCHEERENS H. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 116:1310-1316.

ZHOU J.S., GOPAL P.K., and GILL H.S. 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int J Food Microbiol.* 63:81-90.

ZOUALI H., LESAGE S., MERLIN F., CEZARD J. P., COLOMBEL J. F., BELAICHE J., ALMER S., TYSK C., and ET AL. 2003. CARD4/NOD1 is not involved in inflammatory bowel disease. *Gut.* 52:71-74.
