

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Lek. med. Piotr Rozpondek

**Występowanie antygeny HLA-G i wybranych wskaźników
zapalnych u chorych na nieswoiste zapalenia jelit**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Tomasz Mach

Pracę wykonano w: Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i
Chorób Zakaźnych Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Tomasz Mach

Kraków, 2012

Składam serdeczne podziękowania

dla Promotora pracy

prof. dr hab. Tomasza Macha

za wyrozumiałość, cierpliwość

oraz pomoc i cenne wskazówki

w trakcie pisania pracy

Wykaz skrótów

AIEC – adhezyjno-inwazyjny szczep *Escherichia coli*

ANCA – przeciwciała przeciwko granulocytom obojętnochłonnym

ASCA – przeciwciała przeciwko *Saccharomyces cerevisiae*

AZS – atopowe zapalenie skóry

CDAI – wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego – Crohna

ChL-C – choroba Leśniowskiego – Crohna

CMV – wirus cytomegalii

ECCO – European Crohn's and Colitis Organisation

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

Hb – hemoglobina

Hct – hematokryt

HIV - ludzki wirus niedoboru odporności

HLA – antygen zgodności tkankowej

HSV – ludzki wirus opryszczki pospolitej

IL-1 – interleukina 1

IL-10 – interleukina 10

IL-12 – interleukina 12

IL-13 – interleukina 13

IL-17 – interleukina 17

IL-18 – interleukina 18

IL-23 – interleukina 23

IL-4 – interleukina 4

IL-6 – interleukina 6

INF- γ – interferon γ

LIF – czynnik hamujący białaczkę

LPS – lipopolisacharyd

MAP – *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MHC – główny układ zgodności tkankowej

NMR – rezonans magnetyczny

NZJ – nieswoiste zapalenia jelit

PLT – płytki krwi

PMBC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PSC – pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych

RBC – erytrocyty

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SD – odchylenie standardowe

sHLA-G – rozpuszczalny antygen zgodności tkankowej G

SM – stwardnienie rozsiane

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β

TK – tomografia komputerowa

TNF- α – czynnik martwicy guza α

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

WBC – leukocyty

WZJG – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

ZJN – zespół jelita nadwrażliwego

Spis treści

Wykaz skrótów	3
1. Wstęp	8
1.1. Wprowadzenie	8
1.2. Epidemiologia nieswoistych zapaleń jelit	9
1.3. Etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit	10
1.3.1. Wprowadzenie	10
1.3.2. Podłoże genetyczne	11
1.3.3. Czynniki środowiskowe	14
1.3.4. Odpowiedź immunologiczna	16
1.3.4.1. Wprowadzenie	16
1.3.4.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna	17
1.3.4.3. Rola cytokin w nieswoistych zapaleniach jelit	18
1.4. Objawy nieswoistych zapaleń jelit	22
1.4.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna	22
1.4.2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	25
1.4.3. Powikłania pozajelitowe nieswoistych zapaleń jelit	28
1.5. Zespół jelita nadwrażliwego	29
1.6. Antygen HLA-G	31
1.6.1. Wprowadzenie	31
1.6.2. Rola HLA-G w ciąży	33
1.6.3. Znaczenie HLA-G w utrzymaniu przeszczepu	34
1.6.4. Znaczenie HLA-G w chorobach nowotworowych	35
1.6.5. Rola HLA-G w chorobach infekcyjnych	37
1.6.6. Znaczenie HLA-G w chorobach autoimmunologicznych	37
1.6.7. Znaczenie HLA-G w nieswoistych zapaleniach jelit	39
2. Cel pracy	43
3. Materiał i metody	44
3.1. Materiał	44

3.2. Kryteria rozpoznania i oceny ciężkości choroby Leśniowskiego-Crohna	45
3.3. Kryteria rozpoznania i oceny ciężkości wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	46
3.4. Kryteria rozpoznania zespołu jelita nadwrażliwego	48
3.5. Badania morfologiczne i biochemiczne krwi	49
3.6. Badanie stężenia sHLA-G w surowicy	49
3.7 Metody statystyczne	52
4. Wyniki	54
4.1. Charakterystyka badanych grup	54
4.2. Wyniki badań analitycznych	57
4.2.1. Wyniki badań analitycznych w grupie chorych na ChL-C	58
4.2.2. Wyniki badań analitycznych w grupie chorych na WZJG	64
4.3. Wyniki oznaczenia rozpuszczalnego HLA-G w surowicy	73
4.3.1. sHLA-G w surowicy krwi badanych grup chorych	73
4.3.2. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem płci badanych chorych	76
4.3.3. sHLA-G w surowicy krwi z uwzględnieniem stopnia aktywności choroby	79
4.3.4. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem stosowanego leczenia immunosupresyjnego	80
4.3.5. sHLA-G w surowicy chorych z NZJ w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby	84
4.3.6. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem lokalizacji zmian zapalnych	89
4.3.7. sHLA-G w surowicy chorych na ChL-C z uwzględnieniem powikłań choroby	92
4.3.8. Korelacja pomiędzy sHLA-G a wartością CDAI w grupie chorych na ChL-C	93
4.3.9. Korelacje pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy a wiekiem, czasem trwania choroby oraz wynikami badań biochemicznych	94

5. Dyskusja	97
6. Wnioski	105
7. Streszczenie	106
8. Abstract	109
9. Spis tabel	111
10. Spis rycin	113
11. Piśmiennictwo	117

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) są chorobami przewodu pokarmowego o przewlekłym charakterze, z okresami zaostrzeń i remisji. Upośledzają jakość życia i wymagają przewlekłego leczenia. Zaliczamy do nich chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG). Choroby te mają złożoną i wciąż nie do końca poznaną etiopatogenezę. Czynniki genetyczne, immunologiczne, środowiskowe i infekcyjne mogą prowadzić do rozwoju w obrębie przewodu pokarmowego przewlekłego, patologicznego procesu zapalnego, w wyniku którego powstają zmiany charakterystyczne dla NZJ [1,103]. WZJG cechuje występowanie rozległych, ciągłych i powierzchownych zmian zapalnych, a w okresie zaostrzenia owrzodzeń w błonie śluzowej jelita grubego. W ChL-C zmiany zapalne nie są ciągłe, odcinkowe i mogą pojawić się na całej długości przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż po odbyt. Charakterystyczny proces zapalny w tej chorobie obejmuje całą grubość ściany jelita, a częstymi jej powikłaniami są przetoki, zwężenia oraz ropnie.

HLA-G jest antygenem HLA klasy I charakteryzującym się niskim polimorfizmem alleli, ograniczoną dystrybucją w tkankach oraz obecnością siedmiu izoform: trzech rozpuszczalnych oraz czterech tkankowych, związanych z błoną komórkową [2,33]. Antygen HLA-G początkowo został wykryty w komórkach cytotrofoblastu, gdzie bierze udział w utrzymaniu stanu tolerancji pomiędzy matką i semiallogenicznym płodem [90]. Udokumentowano zróżnicowaną prezentację izoform antygeny HLA-G w wielu chorobach autoimmunologicznych, zakażeniach wirusowych i chorobach nowotworowych [14]. Pełnią one również istotną rolę w reakcjach odrzucania przeszczepu [83]. Ich obecność jest powiązana z tolerancją przeciwko komórkowym

reakcjom odpornościowym [14]. Wpływają na cytotoksyczność limfocytów NK, funkcje limfocytów T CD8+ i CD4+ oraz dojrzewanie komórek dendrytycznych [32].

W ostatnim czasie pojawiły się pojedyncze doniesienia na temat różnej ekspresji izoform antygeny HLA-G w ChL-C i we WZJG [89,115]. To zróżnicowanie HLA-G daje potencjalną możliwość wykorzystania oznaczania tego antygeny u chorych dla różnicowania ChL-C z WZJG, zwłaszcza w przypadkach trudnych diagnostycznie.

1.2. Epidemiologia nieswoistych zapaleń jelit

Problem NZJ dotyczy głównie społeczeństw krajów rozwiniętych i rozwijających się. Na świecie obserwuje się częstsze występowanie NZJ w Europie i Ameryce Północnej, niż w Afryce, Azji, Ameryce Południowej [63]. Zapadalność na WZJG wynosi od 1,2 do 20,3 przypadków na 100 000 osób rocznie, chorobowość natomiast od 7,6 do 246 na 100 000 osób rocznie. Zapadalność na ChL-C dotyczy od 0,03 do 15,6 przypadków a chorobowość od 3,6 do 214 przypadków na 100 000 osób rocznie [19]. W wyniku postępu, zmian stylu życia i poziomu higieny, w krajach rozwijających się zaobserwowano początkowy wzrost częstości występowania WZJG, a następnie po ok. 15 latach, stopniowy wzrost zapadalności na ChL-C [63]. Istotny wydaje się fakt, że wśród imigrantów z krajów rozwijających się, którzy przybywają do krajów rozwiniętych, ryzyko zachorowania na NZJ pozostaje niezmienione, jednak jest znacząco wyższe wśród ich dzieci. Spostrzeżenia te sugerują, że najbardziej istotny w rozwoju tych chorób jest wpływ czynników środowiskowych we wczesnym okresie życia [82].

Obserwowane trendy w częstości występowania NZJ można próbować wyjaśnić poprzez zmiany składu i aktywności metabolicznej flory bakteryjnej przewodu pokarmowego. Wraz ze wzrostem industrializacji, poprawia się stan sanitarno-higieniczny, częstość stosowania antybiotyków, zmniejsza się średnia wielkość rodziny,

częstość infekcji pasożytniczych, opóźnia się ekspozycja na zakażenia, częściej spożywane są pokarmy przechowywane w niskich temperaturach [49]. Istotna wydaje się również popularyzacja szczepień ochronnych [63,101]. W sumie prowadzi to do zmian we florze bakteryjnej jelit i zmniejszonej stymulacji układu immunologicznego. Zmniejszona lub zmieniona ekspozycja na antygeny we wczesnym okresie życia może prowadzić do nieprawidłowości w rozwoju odporności i powstania patologicznej, nieadekwatnej odpowiedzi ustroju na infekcje [63]. Pojawiły się doniesienia, że zmniejszona kolonizacja bakteriami komensalnymi z rodzaju *Bifidobacteria* i *Lactobacilli* może być równie istotna dla wystąpienia NZJ, jak zmniejszona ekspozycja na antygeny [43].

Zmniejszona częstość zakażeń pasożytniczych może również prowadzić do zwiększenia zapadalności na NZJ. Infekcje te przyczyniają się do aktywacji odpowiedzi immunologicznej typu Th2 oraz zmniejszenia aktywności odpowiedzi typu Th1, co potencjalnie może chronić przed pojawieniem się chorób o charakterze autoimmunologicznym, zwłaszcza ChL-C, w której przeważa aktywność zapalna typu Th1 [63].

1.3. Etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit

1.3.1. Wprowadzenie

Podobnie jak w przypadku wielu innych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym, których patogeneza nie jest do końca poznana, można rozważać, że wystąpienie NZJ jest wynikiem połączenia podatności genetycznej chorego, czynnika wyzwalającego oraz rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej. W jelicie u osób zdrowych układ immunologiczny pozostaje w stanie tolerancji lub hamowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko niepatogennym bakteriom prawidłowej flory jelitowej oraz antygenom pokarmowym [109]. Wydaje się, że w

przypadku NZJ ten stan tolerancji w stosunku do niektórych składników flory bakteryjnej zostaje utracony, czego dowodem jest obecność przeciwciał ANCA lub ASCA w surowicy chorych odpowiednio na WZJG i ChL-C [68]. Funkcja komórek modulujących odpowiedź immunologiczną u tych chorych jest zaburzona, przez co reakcja zapalna, wywołana przez zwykle niegroźny czynnik wyzwalający, jest w stanie wyjść poza kontrolę układu immunologicznego [68]. Pierwotny defekt komórek regulujących i będąca jego skutkiem reakcja zapalna, powodują produkcję licznych cytokin, modulujących funkcję otaczających tkanek, przez co prowadzą do rozwoju zmian patologicznych i objawowej choroby [68].

1.3.2. Podłoże genetyczne

W ostatnich latach największy postęp w badaniu etiopatogenezy NZJ dokonał się w dziedzinie genetyki [68,97]. Ryzyko rozwinięcia WZJG lub ChL-C u krewnych pierwszego stopnia chorego wynosi odpowiednio 1,6% i 5,2%. W przypadku Żydów Aszkenazyjskich, ryzyko to dla ChL-C zwiększa się do 10-12,6% [18]. Zagrożenie wystąpieniem NZJ u potomstwa znacząco wzrasta, jeśli oboje rodzice są chorzy. Badania nad rodzinami pacjentów z NZJ udokumentowały współistnienie WZJG, jak i ChL-C w obrębie jednej rodziny, co sugeruje, że choroby te współdzielą jeden lub więcej gen predysponujący do ich rozwinięcia [18]. Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić silniej wyrażone tło genetyczne w przypadku ChL-C niż WZJG [8]. W badaniach nad bliźniętami jednojajowymi wykazano u 37-50% współwystępowanie ChL-C wśród rodzeństwa i znacznie niższe, a 10-18% dla WZJG [9,114].

Badania nad genomem ludzkim w poszukiwaniu przyczyn NZJ zaowocowały odkryciem rejonu IBD1, zlokalizowanego na chromosomie 16, wiążącego się z ryzykiem względnym rozwoju ChL-C, wynoszącym 1,3 [18]. Mutacje genu *NOD-2*,

położonego na chromosomie 16, zostały opisane u kilku rodzin z ChL-C. Gen ten zawiera domenę rekrutującą kaspazę (*CARD*), która inicjuje apoptozę, oraz domenę bogatą w leucynę (*LRR*), biorącą udział w interakcjach z lipopolisacharydami bakteryjnymi [8,18]. Uważa się, że mutacje w obrębie genu *NOD-2* zaburzają homeostatyczne relacje między florą bakteryjną a tkanką limfatyczną przewodu pokarmowego lub prowadzą do nasilonej pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na stymulację antygenem u pacjentów z ChL-C [7]. Heterozygotyczność w zakresie polimorfizmu genu *NOD-2* zwiększa ryzyko względne rozwinięcia ChL-C 1,75-4, natomiast homozygotyczność 11-27. Jest to najwyższe ryzyko względne zaobserwowane dla tej choroby w stosunku do pojedynczego genu [30]. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w obrębie genu *CARD15* odpowiada za siedemdziesięciokrotnie zwiększone ryzyko rozwinięcia ChL-C ze zwężeniami przewodu pokarmowego [18].

Dotychczasowe badania wykazały również związek pomiędzy ChL-C a genami *ATG16L1* oraz *IRGM*, pełniącymi istotną funkcję w autofagii [47,69]. Autofagia jest procesem, którego celem jest usuwanie zużytych organelli, ciałek apoptotycznych, ale także jest mechanizmem obronnym przeciwko mikroorganizmom, które przeniknęły do wnętrza komórki [61]. Zaburzenia w ich eliminacji mogą prowadzić do nadmiernego, przewlekłego pobudzenia makrofagów do produkcji cytokin prozapalnych, powodując podsycanie procesu zapalnego w jelicie [18].

Jednym z pierwszych odkrytych czynników genetycznych związanych z ryzykiem wystąpienia WZJG jest region MHC na chromosomie 6, kodujący geny HLA. Najsilniejszy związek opisano dla rzadkiego allelu HLA klasy II DRB1*0103, występującego z częstością 2% w populacji Europy i Ameryki Północnej. Nosicielstwo

tego allelu u chorych z ciężką postacią WZJG wynosi 7,4-11%, wzrastając nawet do 22,8% u pacjentów z manifestacjami pozajelitowymi choroby [114].

Geny kodujące molekuły biorące udział w kaskadzie sygnałowej interleukiny 23 (IL-23), takie jak *IL23R*, *IL12B*, *JAK2* czy *STAT3*, zostały początkowo powiązane z ryzykiem rozwinięcia ChL-C, a następnie również WZJG, co prowadzi do wniosku, że zaburzenia tej drogi sygnałowej grają istotną rolę w patogenezie NZJ [34].

Badania nad genomem doprowadziły do odkrycia mutacji pojedynczego nukleotydu genu *IL10* na chromosomie 1, powiązanego z WZJG [35]. Cytokina przeciwzapalna IL-10 odgrywa centralną rolę w procesie hamowania reakcji zapalnej. Jest produkowana przez limfocyty Th1, Th2, Th2, Tregs, komórki dendrytyczne, makrofagi, mastocyty i limfocyty NK. Podstawą jej działania jest modulacja funkcji limfocytów T oraz B, a także ograniczenie uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i IL-12 [75]. Zaburzenia kaskady sygnałowej związanej z IL-10 u chorych z WZJG zostały opisane już 1995 roku, jednak dopiero niedawne badania dostarczyły bardziej pewnych dowodów na związek mutacji genu *IL-10* z rozwojem WZJG. Zidentyfikowano homozygotyczne, recesywne mutacje prowadzące do utraty funkcji genów *IL10RA* i *IL10RB*, kodujących receptory dla IL-10, u dzieci z dwóch niespokrewnionych ze sobą rodzin, które rozwinęły ciężkie zapalenie jelita w pierwszym roku życia [42]. Prace nad rolą genu *IL-10* w WZJG są kontynuowane, podjęto również próby leczenia przy użyciu rekombinowanej IL-10.

W związku ze znaczącą rolą zaburzeń funkcji bariery nabłonkowej jelita w rozwoju WZJG, dużym zainteresowaniem cieszą się badania nad jej genetyką. Wykazano związek pomiędzy mutacjami genów *ECM1*, *CDH1*, *HNF4* i *LAMB1*, mających istotne znaczenie w funkcjonowaniu i szczelności bariery nabłonkowej a wystąpieniem WZJG [40,114].

Pomimo dużego postępu badań nad genetycznym podłożem NZJ, opisane związki genowe odpowiadają zaledwie za ok. 20% dziedzicznego ryzyka zachorowania [103]. Prowadzone w dalszym ciągu prace dają nadzieję lepszego poznania etiopatogenezy NZJ.

1.3.3. Czynniki środowiskowe

Rola czynników genetycznych nie jest wystarczająca do pełnego wyjaśnienia etiopatogenezy NZJ. Współwystępowanie NZJ jedynie u ok. 50% bliźniąt jednojajowych jednoznacznie wskazuje na znaczącą rolę czynników środowiskowych [45,46]. Badania kliniczne wskazują, że czynniki uszkodzające barierę śluzówkową przewodu pokarmowego mogą powodować ujawnienie się tych chorób. Należą do nich niesteroidowe leki przeciwzapalne, infekcje bakteryjne i wirusowe, antybiotyki [68,133]. Rola stosowanej diety w rozwoju NZJ jest niejasna, jednak postuluje się, że może ona zmieniać skład flory bakteryjnej jelita i w ten sposób pośrednio wpływać na przebieg schorzenia. Palenie papierosów jest udowodnionym czynnikiem ryzyka w ChL-C, ma natomiast działanie ochronne w WZJG. Możliwe jest, że różne czynniki środowiskowe, oddziałując na osoby z różną predyspozycją genetyczną, mogą prowadzić do rozwinięcia innych postaci tej samej choroby zapalnej jelit [18,68].

Nabłonek jelitowy pełni funkcję bariery chroniącej przed przenikaniem bakterii i innych antygenów w głąb ściany jelita. Szczelność bariery jelitowej zależy od obecności ciasnych połączeń międzykomórkowych i jest znacznie zmniejszona w NZJ. Może być to zarówno wynikiem genetycznych zaburzeń w funkcji bariery, jak również efektem wtórnym do toczącego się procesu zapalnego [118]. Dodatkową rolę obronną pełnią komórki kubkowe, produkujące śluz i czynniki stymulujące gojenie się nabłonka oraz hamujące procesy zapalne, jak również komórki Panetha, produkujące substancje zwalczające mikroorganizmy, takie jak α -defensyny [1]. W NZJ reakcja zapalna

proceeds frequently to the exacerbation of the mucosa, ulcers and fistulas, which in the result decreases the production of protective factors and increases the exposure to the bacterial flora of the gut, exacerbating inflammation [105,127].

Increased permeability of the mucosal barrier, resulting from the action of genetic or environmental factors, allows for a significantly greater interaction between the gut bacterial flora and the host organism. An exaggerated and poorly controlled immunological response of the gastrointestinal tract to the primary exposure can lead to the transformation of physiological defense reactions into a pathological, prolonged disease process [9,97].

The significance of exposure to bacteria in the etiology of NZJ is confirmed by the observed effectiveness of antibiotic therapy and the demonstrated necessity of the presence of bacteria for the development of inflammation in the majority of murine models of gut inflammation [1,97]. Despite many years of research, it has not been possible to identify a specific bacterial species responsible for the development of NZJ. The first experiments in this field were conducted in the 1980s of the 20th century with *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), suspected to play a significant role in the etiology of ChL-C, due to the morphological similarities of inflammatory changes in MAP infection and in ChL-C. In a large clinical trial, in which the effectiveness of treatment of patients with ChL-C was compared with two anti-tubercular drugs and placebo, after 2 years no significant differences in the course of the disease were observed [97]. Some researchers still believe that MAP plays a significant role in the development of ChL-C, even if it does not influence the later course of the disease [97].

Another bacterium, studied in the context of identifying the etiological factor of NZJ, is the adherent-invasive strain of *Escherichia coli* (AIEC), which has the ability to adhere and invade the mucosal cells of the gut. It has been shown that the presence of this bacterium is more frequent in patients with ChL-C than in those with NZJ and in healthy individuals, however

celowana antybiotykoterapia, zgodna z antybiogramem, nie przyniosła poprawy w badanej grupie chorych na ChL-C [20,91].

Niepowodzenia w próbach identyfikacji gatunku wywołującego NZJ i jednocześnie silne dowody na ważną rolę bakterii w etiopatogenezie NZJ, pozwalają sądzić, że bardziej istotna dla rozwoju choroby jest sama obecność oraz ilość bakterii w przewodzie pokarmowym, niż ich przynależność gatunkowa [97].

1.3.4. Odpowiedź immunologiczna

1.3.4.1. Wprowadzenie

Odpowiedź immunologiczna organizmu składa się z odpowiedzi nieswoistej i swoistej. Reakcja nieswoista jest odpowiedzialna za wczesną odpowiedź organizmu na zakażenie. Jej celem jest lokalizacja i usunięcie patogenu, niezależnie od jego typu. Przebieg reakcji nieswoistej nie zależy od pamięci immunologicznej – w jej trakcie odpowiedzialne za nią są: bariera nabłonkowa oraz komórki fagocytyzujące, takie jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne [70]. Odpowiedź swoista rozwija się, gdy czynnik infekcyjny przełamał mechanizmy obronne odpowiedzi nieswoistej, bądź w przypadku reinfekcji. Charakteryzuje się ona pamięcią immunologiczną i zdolnością do rozpoznawania antygenów [68]. Głównymi komórkami odpowiedzialnymi za reakcję swoistą są limfocyty T i B. Swoista odpowiedź organizmu na stymulację antygenem jest inna w przypadku ChL-C i WZJG. W ChL-C przeważa aktywacja limfocytów Th1, związana z wydzielaniem dużych ilości takich cytokin, jak: TNF- α , IFN, IL-2, IL-6, IL-8 [84]. Komórki Th1 stymulują głównie odpowiedź komórkową, aktywując cytotoksyczne limfocyty T, makrofagi i komórki NK. We WZJG dominuje odpowiedź typu humoralnego, z nietypową odpowiedzią typu Th2 i zwiększonym wytwarzaniem IL-5, IL-10, IL-13 i TNF- α [68].

1.3.4.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna

W ostatnich latach pojawiło się wiele dowodów świadczących o tym, że ChL-C nie jest pierwotnie stanem nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, ale że u jej podłoża leży defekt odporności [39,41]. W latach '70 XX wieku pojawiły się pierwsze doniesienia, że w patogenezie ChL-C może mieć znaczenie osłabiona odpowiedź immunologiczna i niekompletne usuwanie bakterii i obcych antygenów w jelitach. Następnie wykazano osłabioną migrację neutrofili do okien skórnych u chorych na ChL-C w porównaniu do WZJG i ludzi zdrowych [106]. Zwiększenie przepływu krwi w miejscu podskórnego wstrzyknięcia zabitych ciepłem bakterii *Escherichia coli* okazało się znacząco niższe u osób z ChL-C względem grupy kontrolnej. Kolejne doświadczenia udowodniły upośledzoną migrację znakowanych neutrofili i osłabione usuwanie znakowanych *E. coli* podanych podskórnice u pacjentów z ChL-C. Stwierdzono znacząco obniżoną produkcję cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-15 i IFN- γ przez makrofagi chorych na ChL-C po stymulacji zabitymi ciepłem *E.coli*, w porównaniu do makrofagów ludzi zdrowych, bądź pacjentów z WZJG [106].

Brak ostrej fazy pierwotnego zapalenia błony śluzowej wraz z upośledzonym usuwaniem bakterii i ich szczątków może prowadzić do rozwinięcia przewlekłego procesu zapalnego, z tworzeniem ziarniniaków, których funkcją jest ograniczenie materiału zakaźnego i zmniejszenie szerzenia się bakterii. Makrofagi, które zawierają sfagocytowane bakterie, pozostają w stanie ciągłej aktywacji, produkując cytokiny prozapalne i stymulując migrację limfocytów T do miejsca zapalenia oraz ich dojrzewanie w fenotyp Th1 [53]. Po pewnym czasie migracja leukocytów, stymulowana przez makrofagi, prowadzi do dużego ich nagromadzenia, pozwalając, mimo

zmniejszonego wydzielania cytokin przez indywidualne komórki, na produkcję patologicznych stężeń cytokin oraz uszkodzenia tkanek [16].

Jeżeli przyjmiemy, że u podłoża ChL-C leży niedobór odporności, to można by oczekiwać zwiększonej podatności na infekcje bakteryjne innych narządów i układów u tych pacjentów. Istnieją doniesienia o zwiększonej częstości infekcji dróg moczowych i ostrych zakażeń żołądkowo-jelitowych wśród chorych z ChL-C, ale główną przyczyną, dla której możemy nie obserwować takiej zależności, jest ilość bakterii w przewodzie pokarmowym. Większość ostrych infekcji rozwija się ze stosunkowo niewielkiej ilości patogennych mikroorganizmów, podczas gdy w jelicie znajduje się 10^8 - 10^{11} bakterii na gram treści jelitowej. Możliwe jest więc, że tak duża ich ilość pozwala im przełamać już tylko nieco osłabiony układ odpornościowy [100].

Pomimo że przewlekły stan zapalny w ChL-C może mieć charakter wtórny do pierwotnego defektu odpowiedzi immunologicznej, to właśnie jego konsekwencją są obserwowane klinicznie zmiany organiczne, jak owrzodzenia, przetoki, zwężenia, jak również objawy pozajelitowe. Leczenie immunosupresyjne oraz przeciwciała przeciwko TNF- α w tym stadium choroby, prowadzą do zmniejszenia objawów i poprawy stanu pacjentów poprzez blokadę cytokin i aktywację apoptozy leukocytów. Stosowanie glikokortykosteroidów, pomimo tłumienia przez nie przewlekłego stanu zapalnego i indukowania remisji, nie jest skuteczne w zapobieganiu nawrotom i może prowadzić do nasilania pierwotnego niedoboru odporności [100].

1.3.4.3. Rola cytokin w nieswoistych zapaleniach jelit

Cytokiny są niewielkimi peptydami produkowanymi głównie przez komórki układu odpornościowego, odpowiedzialnymi za komunikację międzykomórkową, stymulację proliferacji komórek efektorowych odpowiedzi swoistej, mediację lokalnych i uogólnionych procesów zapalnych na drodze autokrynnej, parakrynnej i endokrynnej

[78]. Swoista odpowiedź immunologiczna odgrywa bardzo ważną rolę w NZJ. Zaburzenia regulacji i aktywacji komórek Th1, Th2 i Th17 wydają się stanowić podłoże rozwoju i zaostrzenia NZJ. Złożona sieć wzajemnych zależności, modulowana zarówno przez cytokiny prozapalne, jak i przeciwzapalne, jest obiektem licznych badań od wielu lat [95].

Najlepiej poznanymi cytokinami prozapalnymi są $\text{TNF}\alpha$, IL-1 i IL-6. $\text{TNF}\alpha$ stymuluje procesy zapalne poprzez zwiększenie produkcji IL-1 β i IL-6, ekspresję cząsteczek adhezyjnych, proliferację fibroblastów i wydzielania czynników prozakrzepowych, a także inicjuje procesy cytotoksyczności, apoptozy, stymuluje odpowiedź ostrej fazy. Stężenie $\text{TNF}\alpha$ w surowicy oraz tkankach jelita grubego pacjentów zarówno z WZJG, jak i ChL-C, pozytywnie koreluje z nasileniem klinicznych i laboratoryjnych wskaźników aktywności choroby [110]. Skuteczność przeciwciał anti- $\text{TNF}\alpha$ u pacjentów z NZJ potwierdza istotne znaczenie tej cytokiny [84]. Kaskada sygnałowa $\text{TNF}\alpha$ rozpoczyna się od rozpuszczalnych w surowicy receptorów sTNF-R I i II. Stężenie sTNF-R I w surowicy pacjentów z NZJ jest wyższe niż w populacji zdrowej, natomiast stężenie sTNF-R II jest znacząco wyższe w surowicy chorych z aktywną ChL-C niż u chorych z WZJG – potencjalnie daje to możliwość wykorzystania go jako dodatkowego testu diagnostycznego [95].

Na rodzinę IL-1 składa się ponad 10 cytokin, z których najważniejsze są IL-1 α , IL-1 β oraz IL-18 [25]. IL-1 α jest aktywna w formie prekursora i występuje wewnątrz oraz na powierzchni komórek, które ją wytwarzają. IL-1 β jest postacią sekrecyjną, produkowaną przez komórki krwi obwodowej, a także komórki zmienionego zapalnie przewodu pokarmowego [84]. Inicjuje ona i nasila proces zapalny w jelicie grubym poprzez stymulację limfocytów T do produkcji innych cytokin prozapalnych, przyspiesza proliferację i różnicowanie limfocytów B, nasila uwalnianie czynników

wzrostu i chemotaktycznych, powodując migrację komórek fagocytyzujących do śluzówki jelita [84]. IL-1 ma również działanie ogólnoustrojowe, powodując podwyższenie temperatury ciała i syntezę białek ostrej fazy [25]. Działanie IL-1 jest hamowane przez antagonistę receptora IL-1Ra, którego podwyższone stężenia są obecne w surowicy i tkankach pacjentów z NZJ. Stosunek stężenia IL-1Ra do IL-1 znacząco spada w trakcie zaostrzenia NZJ, co może być jednym z elementów patogenezы choroby [26].

IL-18, produkowana przez komórki nabłonka jelit, stymuluje sekrecję IFN- γ , IL-1 β i TNF- α , hamuje natomiast syntezę przeciwzapalnej IL-10. Stwierdzono podwyższone stężenie IL-18 w próbkach pobranych z aktywnych zmian zapalnych u części pacjentów z ChL-C [68]. Badania na modelu zwierzęcym sugeruje ważną rolę tej cytokiny w patogenezie WZJG. Myszy pozbawione genu *IL-18* były odporne, natomiast myszy z nadekpresją IL-18 bardziej podatne na rozwój WZJG [84]. Istnieją doniesienia, że IL-18 wraz z IL-12 indukują dojrzewanie limfocytów T w kierunku fenotypu Th1 [79].

IL-6 jest cytokiną prozapalną o działaniu plejotropowym, wywierającą swój wpływ poprzez rozpuszczalny receptor sIL-6R. Blokada tego układu prowadzi do nasilonej apoptozy limfocytów T, co sugeruje, że działanie tej interleukiny może polegać na ochronie i przedłużeniu aktywności limfocytów T [95]. IL-6 jest produkowana przez monocyty, makrofagi, komórki śródbłonka, limfocyty T i B. Stężenie IL-6 w surowicy koreluje pozytywnie z nasileniem i rozległością zmian zapalnych w przebiegu WZJG [84].

Cytokiną o działaniu przeciwzapalnym, pełniącą ważną rolę w procesach zachodzących w śluzówce jelita, jest IL-10. Jej wpływ wyraża się poprzez hamowanie procesu prezentacji antygeny, inhibicję sekrecji cytokin prozapalnych przez limfocyty Th1, monocyty i makrofagi oraz zmniejszenie uwalniania reaktywnych związków tlenowych i tlenku azotu [44]. W modelu zwierzęcym, u myszy z blokadą genu *IL-10*

dochodzi do rozwoju procesów zapalnych w obrębie przewodu pokarmowego. Badania u chorych na WZJG wykazały podwyższone stężenia IL-10 w surowicy [129]. Zmienione zapalnie tkanki i ziarniniaki w ChL-C wykazują niskie stężenia tej cytokiny [95].

Innymi cytokinami przeciwzapalnymi, których rola została słabiej zbadana w NZJ, są IL-4 i TGF- β . IL-4 hamuje wytwarzanie TNF- α , IL-1, IL-6 przez monocyty i makrofagi [84]. Działa immunosupresyjnie w tkankach jelita, zmniejszając wydzielanie VEGF w aktywnym NZJ. IL-4 odgrywa również rolę w transformacji odpowiedzi immunologicznej typu Th2 w Th1 [84,95]. Uważa się, że TGF- β jest istotnym regulatorem immunologicznej homeostazy i odpowiedzi zapalnych. Zmniejszona aktywność TGF- β może być odpowiedzialna za rozwój wielu chorób immunologicznych. W przebiegu NZJ występuje upośledzenie kaskady sygnałowej TGF- β 1 w związku z wysokimi poziomami Smad7 [73]. Chorzy na WZJG wykazują zwiększoną produkcję TGF- β 1 przez komórki jednojądrzaste blaszki właściwej w porównaniu z pacjentami z ChL-C i grupą kontrolną, sugerując, że pomimo posiadania ogólnoustrojowych właściwości immunosupresyjnych, TGF- β może wykazywać lokalny efekt prozapalny [22]. W eksperymentalnych modelach WZJG wykazano skuteczność zahamowania Smad7 w przywróceniu normalnej funkcji TGF- β 1 i cofnięciu się zmian zapalnych [95].

Interleukiny IL-12 i IL-23 należą do rodziny IL-12, heterodimerycznych cytokin prozapalnych. Pomimo dużego podobieństwa zarówno w ich budowie, jak i w budowie receptorów, kontrolują one różne szlaki immunologiczne. Ekspresja IL-12 jest podwyższona w aktywnym WZJG i ChL-C i wzrost ten koreluje z aktywnością choroby [126]. W ChL-C najwyższe stężenia IL-12 występują we wczesnych stadiach choroby. IL-12 w NZJ jest produkowana głównie przez komórki dendrytyczne, co sugeruje jej

udział w stymulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej [58]. W modelu zwierzęcym wykazano, że to IL-23, a nie IL-12 jest niezbędna do rozwinięcia przewlekłego stanu zapalnego w jelicie [130]. Dalsze badania nad tym tematem są potrzebne do poznania szczegółowej funkcji tych cytokin w patogenezie NZJ u człowieka.

Dużą uwagę poświęca się w ostatnim czasie limfocytom Th17 i produkowanej przez nie IL-17, która stymuluje migrację komórek układu odpornościowego do tkanek obwodowych oraz zwiększa sekrecję TNF- α , IL-6 i IL-1 β , sugerując rolę w lokalizacji i amplifikacji procesu zapalnego. Wykazano obecność ekspresji mRNA-17 w śluzówce pacjentów z WZJG, w przeciwieństwie do śluzówki zdrowego jelita. Stwierdzono wyższą ekspresję IL-17 oraz liczbę limfocytów Th17 w jelicie grubym pacjentów z ChL-C niż z WZJG, ilość limfocytów Th17 zmieniała się wraz z aktywnością procesu zapalnego [36]. Jest możliwe, że zwiększone stężenia IL-17 w surowicy i śluzówce pacjentów z NZJ są związane z odpowiedzią na miejscowy proces zapalny [84].

Istnieją sprzeczne doniesienia na temat roli IL-13 w NZJ. W badaniach obejmujących grupę dzieci z NZJ wykazano istotnie wyższe stężenie IL-13 w błonie śluzowej jelita grubego u pacjentów z ChL-C niż u chorych na WZJG [134]. Z kolei badania nad komórkami jednojądrzastymi blaszki właściwej jelita grubego chorych na WZJG wykazały wysokie stężenie IL-13 [48]. Autorzy tych prac powiązali sekrecję IL-13 z nietypowymi limfocytami NK i postulują, że IL-13 może upośledzać funkcję bariery nabłonkowej poprzez wpływ na apoptozę komórek nabłonka oraz rozluźnienie połączeń międzykomórkowych [37,48].

1.4. Objawy nieswoistych zapaleń jelit

1.4.1. Choroba Leśniowskiego-Crohna

Diagnostyka ChL-C jest często trudna, a rozpoznanie niejednokrotnie stawia się stosunkowo późno, ze względu na fakt, że najczęstsze objawy choroby są bardzo

niecharakterystyczne. Należą do nich osłabienie, złe samopoczucie, wzdęcia, okresowe bóle brzucha, czasem biegunka [107]. Innymi objawami ogólnymi mogą być gorączka i utrata masy ciała [107]. Obraz kliniczny jest zależny od lokalizacji zmian w przewodzie pokarmowym. W przypadku najczęstszej lokalizacji, obejmującej końcowy odcinek jelita krętego, ChL-C może rozwijać się powoli, manifestując się dolegliwościami bólowymi w prawym podbrzuszu, biegunką, zwykle bez domieszki krwi, utratą masy ciała, stanami podgorączkowymi, niedokrwistością [76]. W niektórych przypadkach początek choroby jest gwałtowny, objawy rozwijają się bardzo szybko i przypominają ostre zapalenie wyrostka robaczkowego – wielu chorych jest z tego powodu operowanych, co może prowadzić do dalszych powikłań. Pacjenci, u których dochodzi do zajęcia jelita grubego, prezentują objawy bardzo zbliżone do WZJG, dominuje biegunka, chociaż zwykle bez domieszki krwi, oraz bóle brzucha. Dość często zmiany patologiczne lokalizują się w okolicy odbytu, są to owrzodzenia, szczeliny odbytu, ropnie i przetoki okołodbytnicze [98]. U około 5% chorych pierwotne zmiany w ChL-C lokalizują się w jamie ustnej, mają postać aftowych, nie gojących się owrzodzeń [112]. W rzadkich przypadkach zmiany dotyczą żołądka bądź dwunastnicy z objawami przypominającymi chorobę wrzodową lub zwężenie odźwiernika. Przeważają bóle brzucha zlokalizowane w nadbrzuszu, nudności, czasem z towarzyszącymi wymiotami [76].

Odchylenia w rutynowych badaniach laboratoryjnych są cenne w ocenie aktywności procesu chorobowego, a także w monitorowaniu leczenia. W okresie zaostrzeń obserwujemy niedokrwistość, leukocytozę, podwyższone OB i wzrost stężenia CRP w surowicy, hipoproteinemię oraz hipoalbuminemię. W diagnostyce ChL-C pomocne jest oznaczenie przeciwciał przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), gdyż wynik pozytywny w klasie IgG i IgA jest charakterystyczny dla tej choroby [107].

Badania obrazowe odgrywają istotną rolę zarówno dla ustalenia rozpoznania, jak i w diagnostyce ewentualnych powikłań jelitowych i pozajelitowych. Pomocny w ocenie zmian w jelicie cienkim jest radiologiczny pasaż jelita cienkiego z kontrastem podawanym doustnie. Tomografia komputerowa, a zwłaszcza rezonans magnetyczny, pozwalają z dużą czułością i swoistością ocenić patologię ścian jelit, a także umożliwiają obrazowanie zmian znajdujących się poza światłem przewodu pokarmowego, w szczególności guzów zapalnych i ropni [94].

Badania endoskopowe, w tym przede wszystkim kolonoskopia w przypadku zajęcia jelita grubego i końcowego odcinka jelita cienkiego oraz gastroscopia w przypadku zmian w górnym odcinku przewodu pokarmowego, pozwalają na makroskopową ocenę rozległości zmian zapalnych w śluzówce, a co najważniejsze, na pobranie wycinków do badania histopatologicznego. W ChL-C w obrazie mikroskopowym obserwujemy zwykle nieserowaciejące ziarniniaki zbudowane z komórek nabłonkowatych, komórek olbrzymich typu Langhansa i limfocytów. Pomimo, że nie jest to obraz patognomoniczny dla ChL-C, badanie histopatologiczne pozwala na różnicowanie z WZJG oraz zmianami nowotworowymi [52]. Ze względu na śródścienne nacieki zapalne w ChL-C, częstość wykrywania charakterystycznych dla tej choroby zmian w wycinkach pobranych przy pomocy endoskopii nie przekracza 60-70% [5].

Charakterystyczne dla przebiegu ChL-C jest tworzenie się powikłań miejscowych, głównie w postaci przetok zewnętrznych lub wewnętrznych oraz ropni. Najczęstszymi przetokami miejscowymi są połączenia między jelitem cienkim a kątnicą, inną pętlą jelita cienkiego, esicą, pęcherzem moczowym i pochwą. Przetoki zewnętrzne są połączeniami pętli jelit z powłokami skórnymi. Najczęściej występującymi przetokami zewnętrznymi są przetoki okołodbytnicze. W okolicy odbytu obserwujemy również częste tworzenie się ropni i szczelin odbytu. Zmiany zapalne ścian jelit w przebiegu

ChL-C mogą również doprowadzić do znacznego zwężenia światła z objawami podniedrożności lub niedrożności. Groźnymi, ale rzadkimi powikłaniami choroby, są perforacje przewodu pokarmowego z zapaleniem otrzewnej, masywne krwotoki i toksyczne rozdęcie jelita grubego. Ryzyko rozwoju raka jelita grubego jest podwyższone u pacjentów z ChL-C, jednak w mniejszym stopniu niż w WZJG [76].

1.4.2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Podstawowymi i najczęstszymi objawami w WZJG są biegunka z domieszką krwi w stolcu oraz dolegliwości bólowe jamy brzusznej. Przy dużym nasileniu zmian zapalnych w jelicie grubym ilość wypróżnień może dochodzić do 20 na dobę. W konsekwencji tych dolegliwości zwykle obserwuje się osłabienie i utratę masy ciała chorego. W przypadku ciężkich zaostrzeń mogą wystąpić cechy odwodnienia, niedokrwistość, tachykardia, obrzęki oraz gorączka [108].

W badaniach laboratoryjnych w okresie zaostrzenia obserwujemy podwyższone parametry stanu zapalnego, takie jak CRP, OB, leukocytoza, nadpłytkowość oraz niedokrwistość z niedoboru żelaza. W przebiegu cięższych zaostrzeń mogą również występować hipoalbuminemia oraz zaburzenia elektrolitowe. U około 60% chorych obecne są w surowicy przeciwciała przeciwko okołojądrowemu antygenowi granulocytów pANCA, których oznaczenie może pomóc w diagnostyce WZJG, zwłaszcza w różnicowaniu z ChL-C [5].

Najważniejszym badaniem diagnostycznym w WZJG jest kolonoskopia. Makroskopowo w aktywnej fazie WZJG błona śluzowa jelita grubego jest zaczerwieniona, obrzęknięta, ziarnista, matowa i krucha. Obserwuje się krwawienie kontaktowe już po lekkim dotknięciu śluzówki endoskopem. Rysunek naczyń krwionośnych błony śluzowej jest niewidoczny. W cięższych postaciach występują owrzodzenia i polipy rzekome, w świetle jelita widoczna jest krew, śluz, i ropa. W

trakcie remisji choroby śluzówka jelita może być prawidłowa, w długotrwałym przebiegu choroby często obserwujemy polipy rzekome. Wykonywanie pełnej kolonoskopii nie jest wskazane w ostrej fazie choroby, jest natomiast niezbędne do oceny zakresu zmian oraz w nadzorze onkologicznym [108].

W badaniu histopatologicznym w aktywnej fazie choroby obserwuje się nierówną powierzchnię błony śluzowej, przerwanie ciągłości nabłonka w miejscu owrzodzeń, zwiększenie liczby limfocytów i plazmocytów w blaszce właściwej, nacieki granulocytarne i mikroropnie krypt, przekrwienie, zmniejszenie ilości komórek kubkowych. W fazie gojenia następuje zmniejszanie się stopnia przekrwienia, ustępowanie nacieków granulocytowych i ropni krypt, regeneracja komórek kubkowych, odnowa nabłonka i przywrócenie jego ciągłości, zmniejszanie się ilości limfocytów i plazmocytów. W fazie remisji można uwidocznić utratę równoległości i rozgałęzianie cew gruczołowych, zanik błony śluzowej, ścięczenie blaszki mięśniowej błony śluzowej, metaplazję komórek Panetha [52].

Do badań obrazowych znajdujących zastosowanie w WZJG należą tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny oraz kontrastowy wlew doodbytniczy. TK i NMR ujawniają głównie pogrubienie ściany jelita oraz zanik haustracji, ale możliwe jest uwidocznienie głębokich owrzodzeń i polipów. Badania te są również pomocne w diagnostyce zmian podejrzanych o proces nowotworowy. Coraz rzadziej obecnie wykonywany, ze względu na ograniczenia diagnostyczne, kontrastowy wlew doodbytniczy może wykazać ziarnistość, płytkie owrzodzenia błony śluzowej oraz polipy. W zaawansowanej, przewlekłej fazie choroby, może wystąpić zanik haustracji i skrócenie jelita, dając obraz tzw. sztywnej rury. Diagnostyka obrazowa daje możliwość zbadania odcinków jelita położonych proksymalnie od zwężenia jelita grubego, które może wystąpić w przebiegu WZJG [76].

Najczęstszym powikłaniem miejscowym WZJG jest polipowatość zapalna. Jest ona wyrazem ciężkiego uszkodzenia błony śluzowej i występuje u ok. 13% chorych [5]. Niekiedy rozwija się podczas pierwszego rzutu choroby. Groźnym powikłaniem WZJG, które obserwuje się u ok. 5% pacjentów z ciężkim zaostrzeniem, jest ostre rozdęcie okrężnicy [99]. Może do niego dojść w przebiegu ciężkiego rzutu WZJG z zajęciem całej okrężnicy, a przyczynami są głębokie uszkodzenia błony śluzowej, hipokaliemia i hipoproteinemia oraz niekiedy czynniki jatrogenne, jak np. stosowanie leków hamujących perystaltykę. Chorzy są w ciężkim stanie ogólnym, z bólem i wzdęciem brzucha, wysoką gorączką, tachykardią, wzmożonym napięciem i bolesnością uciskową powłok brzusznych, ściszeniem lub zanikiem perystaltyki. W postawieniu rozpoznania pomocne jest wykonanie przeglądowego zdjęcia radiologicznego jamy brzusznej. Jeżeli leczenie zachowawcze (żywienie pozajelitowe, antybiotyki o szerokim spektrum działania, glikokortykosteroidy, wyrównywanie zaburzeń wodemii) nie przyniosą poprawy w trakcie 48 godzin, konieczne jest leczenie operacyjne. Postępowaniem z wyboru jest kolektomia z zachowaniem odbytnicy [99].

Rak jelita grubego rozwija się u ok. 0,5% chorych z WZJG. Najważniejszym czynnikiem ryzyka jest długi czas trwania choroby, powyżej 8 lat, poza tym rozległe zajęcie jelita, rak jelita grubego w wywiadzie rodzinnym oraz pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych [119]. W celu wczesnego wykrycia nowotworu konieczna jest kolonoskopia z pobraniem wycinków i oceną histopatologiczną. Badania w ramach nadzoru onkologicznego zalecane są po 8-10 latach trwania choroby, powinny być przeprowadzane w fazie remisji. W przypadku WZJG z zajęciem całego jelita grubego kolonoskopię należy powtarzać co 1-2 lata, u pacjentów z chorobą ograniczoną do lewej części jelita regularne kontrole zaleca się po 15-20 latach od postawienia rozpoznania.

U chorych ze współistniejącym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych badania kolonoskopowe powinny być powtarzane co rok [5].

Innymi powikłaniami jelitowymi WZJG być mogą: perforacja jelita grubego, masywny krwotok z dolnego odcinka przewodu pokarmowego (oba te powikłania zwykle wymagają leczenia operacyjnego w trybie nagłym), zwężenia jelita, przetoki, ropnie oraz szczeliny [108].

1.4.3. Powikłania pozajelitowe nieswoistych zapaleń jelit

U wielu chorych na NZJ obserwuje się zaburzenia funkcji innych narządów i układów. Ze strony układu kostno-stawowego najczęściej występuje osteopenia i osteoporoza, ale również zapalenia dużych stawów, w ChL-C zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa, zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych. Zapobieganie osteoporozie polega na stosowaniu najmniejszych skutecznych dawek glikokortykosteroidów oraz suplementacji wapnia i witaminy D3 [5].

Powikłaniami zwykle w okresie zaostrzenia NZJ są zmiany skórne, na przykład rumień guzowaty, oraz patologie w zakresie narządu wzroku, jak zapalenie tęczówki. Przeważnie nie wymagają one osobnego leczenia i cofają się wraz z remisją choroby podstawowej [66].

U niektórych chorych na WZJG występują powikłania ze strony wątroby i dróg żółciowych, takie jak stłuszczenie wątroby, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC) i w rzadkich przypadkach rak dróg żółciowych [5]. PSC jest chorobą stanowiącą duży problem terapeutyczny w przebiegu WZJG, gdyż nie reaguje na leczenie glikokortykosteroidami, nie cofa się również po wykonaniu kolektomii i może prowadzić do konieczności przeszczepienia wątroby. Wystąpienie PSC u chorego z WZJG istotnie zwiększa ryzyko rozwoju raka jelita grubego [119].

1.5. Zespół jelita nadwrażliwego

Zespół jelita nadwrażliwego (ZJN) jest bardzo częstą przewlekłą chorobą o nieokreślonej patogenezie, która występuje u 10-20% populacji. Charakterystycznymi objawami są bóle brzucha, zaburzenia rytmu wypróżnień i wzdęcia brzucha. Choroba zaczyna się zwykle w wieku 30-40 lat, kobiety chorują dwukrotnie częściej niż mężczyźni [38].

Wyróżniamy trzy postacie ZJN: biegunkową, zaparciową i mieszaną. Podstawowymi objawami choroby są: dolegliwości bólowe brzucha o charakterze ostrym, kurczowym, zwykle nasilające się po posiłku i zmniejszające się po defekacji. Bóle te praktycznie nigdy nie budzą chorego w nocy. Większość pacjentów skarży się na biegunkę, zaparcia lub naprzemiennie biegunkę z zaparciami. Biegunka charakteryzuje się wodnistymi lub półpłynnymi stolcami, występujące głównie w godzinach porannych, po posiłkach i podczas stresu psychicznego. Nieuformowane stolce często są poprzedzone gwałtownym parciem, natomiast stosunkowo rzadko dochodzi do zwiększenia ich objętości. W postaci zaparciowej chory podaje zmniejszoną liczbę wypróżnień, twardy, często „bobkowaty” stolec, a defekacji towarzyszy duży wysiłek. Po oddaniu stolca często występuje uczucie niepełnego wypróżnienia [38].

Innymi objawami ZJN mogą być wzdęcia, domieszka śluzu w stolcu, nudności, rzadko towarzyszące wymioty, zgaga, bóle głowy, zmęczenie i ogólne złe samopoczucie, a także czasami u kobiet zaburzenia miesiączkowania lub częstomocz [5].

Etiologia ZJN pozostaje niewyjaśniona. Aktualnie trwają badania nad rolą zaburzeń czucia trzewnego i regulacji czynności motorycznej i wydzielniczej jelit oraz nieprawidłowości regulacji osi mózgowo-jelitowej, a zwłaszcza wzmożonej reakcji na

stres i obniżonego progu odczuwania bólu. Coraz częściej zwraca się uwagę na tzw. koinfekcyjny ZJN, który rozwija się po przebyciu biegunki bakteryjnej [5].

Rozpoznanie ZJN ustala się na podstawie tzw. Kryteriów Rzymskich III. Według tych kryteriów, ZJN rozpoznaje się w przypadku występowania bólu lub dyskomfortu (określanego jako przewlekłe nieprzyjemne odczucie, nie będące bólem) w jamie brzusznej przez co najmniej 3 dni w miesiącu i przez ostatnie 3 trzy miesiące, dodatkowo spełniający dwa z trzech poniższych kryteriów:

1. Ustępuje lub zmniejsza się po wypróżnieniu,
2. Początek dolegliwości związany jest ze zmianą częstości wypróżnień,
3. Początek dolegliwości wiąże się ze zmianą charakteru stolca [38].

Przed ustaleniem rozpoznania NZJ przeprowadza się dokładną diagnostykę celem wykluczenia organicznej przyczyny dolegliwości. Objawy takie, jak: gorączka, utrata masy ciała, obecność krwi w stolcu, niedokrwistość, obciążenia w wywiadzie rodzinnym, wskazują na chorobę organiczną i wymagają szczególnej ostrożności w prowadzonym postępowaniu. Do rutynowych badań w przypadku podejrzenia ZJN należą: morfologia krwi obwodowej, CRP, badania biochemiczne krwi, badanie ogólne moczu, badanie bakteriologiczne oraz parazytologiczne stolca, test na krew utajoną w kale, rektoskopia lub sigmoidoskopia. W przypadku podejrzenia przyczyny organicznej, proces diagnostyczny można rozszerzyć o kolonoskopię, USG lub tomografię komputerową jamy brzusznej, pasaż radiologiczny jelita cienkiego oraz gastrokopię [5].

1.6. Antygen HLA-G

1.6.1. Wprowadzenie

Zespół genów, kodujących białka głównego układu zgodności tkankowej, znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 6. Proteiny te są niezwykle polimorficzne i mogą być podzielone na dwie klasy, HLA-I i HLA-II. Częsteczki należące do klasy HLA-I są heterodimerami złożonymi z łańcucha ciężkiego α połączonego z $\beta 2$ mikroglobuliną, stanowiącą łańcuch lekki. Białka klasy HLA-II są heterodimerami zbudowanymi z podjednostek α i β , nie będącymi $\beta 2$ mikroglobulinami [113].

Antygeny układu HLA znajdują się przede wszystkim na powierzchni błony komórkowej, jednak w większości posiadają również formy rozpuszczalne. Białka klasy HLA-I znajdują się na powierzchni prawie wszystkich komórek posiadających jądro, natomiast antygeny klasy HLA-II są ograniczone tylko do komórek prezentujących antygen, komórek endotelium oraz aktywowanych limfocytów T. Białka klasy HLA-I zwykle wiążą antygeny wewnątrzkomórkowe i prezentują je cytotoksycznym limfocytom T $CD8^+$, a częsteczki klasy HLA-II najczęściej wiążą antygeny pozakomórkowe celem prezentacji limfocytom pomocniczym T $CD4^+$ [113].

Antygen HLA-G jest nieklasycznym antygenem zgodności tkankowej (MHC) klasy Ib. Od klasycznych HLA różni się pod względem genetycznym, strukturalnym i funkcjonalnym. Pierwotnie został opisany w komórkach cytotrofoblastu, gdzie poprzez hamujące działanie na komórki NK wpływa na utrzymanie tolerancji semi-allogenicznego płodu przez organizm matki [92]. Od innych antygenów klasy HLA-I odróżnia go niski polimorfizm alleli, ograniczona dystrybucja w tkankach, posiadanie siedmiu różnych izoform oraz działanie prowadzące do wytworzenia stanu immunologicznej tolerancji [14].

U zdrowych osób obserwuje się podstawowy poziom transkrypcji genu *HLA-G* w większości organów, jednak proces translacji i produkcji antygeny jest ograniczony do tkanek trofoblastu, grasicy, rogówki, macierzy paznokci, trzustki oraz komórek prekursorowych erytropoezy oraz naskórka [13]. Ponadto stwierdzono produkcję białka *HLA-G* po przeszczepach narządów, procesach nowotworowych, chorobach wirusowych oraz autoimmunologicznych. Obserwowano produkcję *HLA-G* przez komórki nowotworowe, komórki zakażone wirusami, komórki przeszczepionych tkanek, ale także przez komórki układu immunologicznego w naciekach zapalnych [13]. Ekspresja *HLA-G* w stanach patologicznych wydaje się być zwiększana przez stres komórkowy, niedobór czynników odżywczych, niedotlenienie, a także progesteron i cytokiny, takie jak GM-CSF, INF- γ , IL-10, TNF- α , TGF- β oraz LIF [14]. W surowicy zdrowych osób stwierdza się obecność rozpuszczalnego antygeny *HLA-G*, którego stężenia wynoszą od 27,7 do 95,8 ng/ml [87].

Antygen *HLA-G* występuje w postaci siedmiu izoform, powstających w skutek alternatywnego składania genu. *HLA-G1*, -*G2*, -*G3* oraz *G4* są formami związanymi z błoną komórkową, natomiast izoformy *HLA-G5*, *G6* i *G7* są rozpuszczalne [13]. Białka *HLA-G* posiadają unikalne właściwości supresji komórek układu odpornościowego poprzez wiązanie z różnymi rodzajami receptorów. Receptory *ILT-2* obecne są na powierzchni limfocytów B, T oraz NK, receptory *BY55*, prezentowane przez limfocyty T, NK i komórki nabłonka, receptory *ILT-4* charakterystyczne dla makrofagów i komórek dendrytycznych, natomiast receptory *KIR2DL4* występują tylko w komórkach NK [83].

Działanie *HLA-G* na komórki efektorowe ma złożony, wieloczynnikowy charakter. W przypadku komórek NK polega ono na hamowaniu cytolizy, zmniejszeniu namnażania komórek, spowolnieniu migracji przez nabłonkową, wywoływaniu

apoptozy, zwiększaniem ekspresji receptorów czynników hamujących, a także zwiększeniu wydzielania czynników stymulujących angiogenezę [14]. HLA-G wpływa na limfocyty T poprzez hamowanie ich proliferacji i cytotoksyczności, indukcję apoptozy, stymulację syntezy cytokin odpowiedzi typu Th2 i zwiększenie syntezy receptorów hamujących [14]. Komórki dendrytyczne pod wpływem HLA-G charakteryzują się zmniejszonym dojrzewaniem oraz osłabioną zdolnością do prezentowania antygeny, a także zwiększoną ekspresją receptorów hamujących [14].

1.6.2. Rola HLA-G w ciąży

Wiele badań wskazuje na istotną rolę HLA-G w ciąży. Poprzez wiązanie z receptorami ILT-2, HLA-G hamuje aktywność komórek NK matki, zmniejsza ich cytotoksyczność i w ten sposób zapobiega uszkodzeniu płodu przez układ immunologiczny [86]. Ponadto, poprzez receptory KIR2DL4 zwiększa sekrecję czynników wzmagających angiogenezę, co sprzyja wytworzeniu środowiska korzystnego dla implantacji i rozwoju łożyska [86]. Udowodniono korelację pomiędzy zmniejszoną produkcją HLA-G a zaburzeniami ciąży prowadzącymi do utraty płodu, takimi jak nawracające spontaniczne poronienia i stany przedrzucawkowe [50]. W badaniach na modelu zwierzęcym zaobserwowano gwałtowny spadek stężenia rozpuszczalnego (sHLA-G) w surowicy myszy po sztucznym przerwaniu ciąży [23]. Na znaczącą rolę HLA-G w rozwoju i podtrzymaniu ciąży wskazują także wyniki badań nad zapłodnieniem *in vitro*. Stężenie HLA-G produkowanego przez embriony koreluje dodatnio z ilością udanych implantacji. Sugeruje to, że produkcja HLA-G przez embriony może uczestniczyć w ich zdolności do nawiązania efektywnej współpracy z endometrium. Odkrycia te mogą pomóc w rozwinięciu zapłodnień metodą *in vitro*, zwłaszcza w aspekcie selekcji zarodków i redukcji ilości ciąż mnogich. Istnieją

doniesienia, że również sHLA-G produkowane przez organizm matki pełni rolę w procesie implantacji i rozwoju ciąży [14].

1.6.3. Znaczenie HLA-G w utrzymaniu przeszczepu

Poznanie roli HLA-G w procesie utrzymania ciąży, która jest szczególnym przykładem przeszczepu semiallogenicznego, stało się powodem rozpoczęcia licznych badań nad znaczeniem HLA-G w przeszczepianiu narządów [93]. Wykryto ekspresję HLA-G w tych komórkach przeszczepów, które są najważniejszymi celami dla układu immunologicznego biorcy, jak komórki wsierdza czy nabłonka przewodów żółciowych. Pacjenci, u których wykryto wyższy poziom ekspresji HLA-G w tkankach przeszczepionych narządów, jak również ci, u których stwierdzono wyższe stężenie sHLA-G w surowicy, charakteryzowali się znacząco niższym odsetkiem ostrego i przewlekłego odrzucania przeszczepu [62]. Zaobserwowano również u tych chorych niższe stężenie przeciwciał reagujących z allogenicznymi HLA, które są głównie odpowiedzialne za reakcje odrzucania przeszczepu. Sugeruje to, że działanie HLA-G w wywoływaniu stanu tolerancji immunologicznej wyraża się również poprzez wpływ na limfocyty B [85]. W badaniu przeprowadzonym na pacjentach po przeszczepie serca stwierdzono wzrost stężenia sHLA-G w surowicy po wprowadzeniu do leczenia leków immunosupresyjnych, takich jak cyklosporyna i takrolimus [65].

Eksperymenty przeprowadzone nad jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej (PMBC) również dostarczają przesłanek, świadczących o funkcji HLA-G. PBMC pobrane od pacjentów po przebytych przeszczepie narządów, które były poddane działaniu wysokich stężeń sHLA-G krążących w surowicy tych chorych, nie reagowały na allogeniczne antygeny [59]. Stwierdzono także, że HLA-G5 wyizolowane z surowicy takich pacjentów mają dolność do hamowania proliferacji allogenicznych

limfocytów T *in vitro* [59]. Ponadto, PBMC pobrane od chorych z wysoką produkcją HLA-G po przeszczepie, mają wysoki odsetek supresorowych limfocytów T [77].

Doniesienia te wymagają przeprowadzenia dalszych badań, jednak dają nadzieję na wykorzystanie monitorowania stężenia sHLA-G u pacjentów po przeszczepach narządów do wyodrębnienia grupy z mniejszym ryzykiem odrzucenia przeszczepu [14]. Te spostrzeżenia mogą pozwolić na stosowanie u tych chorych niższych dawek leków immunosupresyjnych. Istnieje również możliwość, że leczenie przy użyciu HLA-G, jego pochodnych bądź lekami indukującymi jego produkcję, może stanowić nową strategię w zapobieganiu odrzucenia przeszczepu [14].

1.6.4. Znaczenie HLA-G w chorobach nowotworowych

Hamujący wpływ HLA-G na układ odpornościowy i jego zdolność do wytworzenia stanu immunologicznej tolerancji były powodem rozpoczęcia wielu badań nad funkcją HLA-G w rozwoju chorób nowotworowych. Proces powstawania nowotworu można podzielić na trzy fazy: eliminacji, równowagi i ucieczki [121]. W fazie eliminacji organizm, poprzez mechanizmy odpowiedzi nieswoistej i swoistej, dąży do zniszczenia komórek nowotworowych [111]. Pierwotne ognisko choroby jest naciekają limfocyty oraz komórki NK, z dominującą reakcją typu Th1 i dużą sekrecją $INF\gamma$ [111]. $INF\gamma$ stymuluje komórki guza do wzmożonej ekspresji HLA-G, co z kolei może prowadzić do zahamowania funkcji komórek NK, dojrzewania i migracji limfocytów T oraz zmniejszenia prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne, czego skutkiem może być pokonanie przez komórki nowotworowe pierwotnej odpowiedzi i przejście procesu do fazy drugiej, równowagi [121]. Na tym etapie komórki patologiczne są eliminowane z podobną prędkością jak powstają nowe i dochodzi do stopniowej selekcji najbardziej odpornych linii komórkowych [55]. Kiedy proliferacja nowotworu przekracza możliwości obronne organizmu, dochodzi do fazy trzeciej, czyli ucieczki [55]. Komórki

guza, które utraciły antygeny umożliwiające ich rozpoznanie przez układ odpornościowy, prezentują głównie antygen HLA-G na powierzchni błony komórkowej [121]. Szybko rosnące nowotwory zwykle zaburzają równowagę między proliferacją komórek a dostawą tlenu, prowadząc do hipoksji, która może pobudzać ekspresję HLA-G [121]. Obserwuje się również zwiększone stężenie sHLA-G w surowicy chorych, korelujące z masą nowotworu. Krążące sHLA-G w organizmie mogą powodować ogólnoustrojowe osłabienie mechanizmów odpornościowych. Leukocyty rozpoznające związany z błoną komórkową HLA-G w masie guza rozpoczynają produkcję cytokin typowych dla odpowiedzi Th2, między innymi IL-10, której obecność z kolei prowadzi do zwiększonej ekspresji HLA-G [120]. Również krążące we krwi sHLA-G mogą pobudzać komórki układu immunologicznego do systemowej produkcji IL-10 [120]. Immunomodulujące działanie HLA-G może mieć istotne konsekwencje dla immunoterapii nowotworów przy użyciu INF. Jeżeli nie uda się przy jego użyciu szybko zniszczyć komórek guza, wzrost ekspresji HLA-G stymulowany INF może doprowadzić do sprawniejszej ucieczki komórek nowotworowych [121].

Związany z błoną komórkową komórek nowotworowych antygen HLA-G może na drodze trogocytozy (przekazania między komórkami fragmentów błony komórkowej) trafić na powierzchnię komórek NK [17,60]. Takie komórki przestają się namnażać, tracą właściwości cytotoksyczne i zaczynają funkcjonować jako komórki regulatorowe, zdolne do hamowania aktywności innych komórek NK [17,60].

Szerokie znaczenie zarówno rozpuszczalnych, jak i związanych z błoną komórkową izoform HLA-G w chorobach nowotworowych może być potencjalnie wykorzystane do opracowania nowych metod leczenia nowotworów, związanych z zahamowaniem wytwarzania HLA-G bądź blokadą jego receptorów [14].

1.6.5. Rola HLA-G w chorobach infekcyjnych

Podobnie, jak w przypadku chorób nowotworowych, wirusy zakażające komórki organizmu rozwijają strategie obronne, umożliwiające uniknięcie zniszczenia przez układ immunologiczny gospodarza [14]. Oceniając znaczenie HLA-G w procesach zakaźnych, przeprowadzono badania nad jego ekspresją przez komórki zakażone przez wirusa cytomegalii (CMV), ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) oraz wirusy neurotropowe. U chorych zakażonych HIV wykryto zwiększoną ekspresję HLA-G w limfocytach T CD8 oraz w monocytach [64]. Chorzy z postępującym nabytym niedoborem odporności wykazywali podwyższone stężenia sHLA-G w surowicy, w przeciwieństwie do pacjentów ustabilizowanych [28,64]. Niektórzy autorzy wykazali korelację pomiędzy genetycznymi wariantami HLA-G i podatnością na infekcję HIV [33]. Stwierdzono również zwiększoną produkcję sHLA-G przez makrofagi zakażone wirusem CMV [80]. Badania nad wirusami neurotropowymi, jak HSV-1 i wirus wścieklizny, wykazały zwiększoną ekspresję HLA-G w neuronach, przy czym w przypadku HSV dotyczyła ona zarówno komórek zakażonych, jak i otaczających je zdrowych neuronów, natomiast w przypadku wirusa wścieklizny wzrost produkcji HLA-G dotyczył jedynie zainfekowanych neuronów [57,71].

1.6.6. Znaczenie HLA-G w chorobach autoimmunologicznych

Z uwagi na rolę HLA-G w wytworzeniu stanu tolerancji immunologicznej, można oczekiwać zmian w zachowaniu się tego antygenu w chorobach autoimmunologicznych, których rozwój polega na utracie tolerancji immunologicznej względem własnych tkanek organizmu [32]. W dotychczasowych badaniach stwierdzono obniżone stężenie sHLA-G w surowicy chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), astmę oskrzelową i stwardnienie rozsiane (SM) [31,88,125]. W schorzeniach tych niskie stężenia sHLA-G korelują z aktywnością choroby,

sugerując istotne znaczenie zaburzenia hamującej funkcji HLA-G na cytotoksyczny efekt komórek NK i limfocytów T [31,88,125]. Według innych autorów ekspresja HLA-G przez monocyty u chorych na SM jest znacznie zwiększona po rozpoczęciu terapii INF- β , leku często używanego w leczeniu tej choroby [72]. Może to wskazywać, że terapeutyczny efekt INF- β przynajmniej częściowo polega na przywróceniu tolerogenicznej funkcji HLA-G.

W niektórych badaniach wykazano, że w chorobach o podłożu immunologicznym można obserwować wysokie stężenia HLA-G w surowicy. I tak u pacjentów z celiakią wykryto podwyższone stężenie sHLA-G w surowicy, jak również wykazano związek między stężeniem sHLA-G a występowaniem innych chorób autoimmunologicznych [116]. Autorzy sugerują, że zwiększona ekspresja HLA-G może być wynikiem próby przywrócenia przez organizm chorego stanu tolerancji względem gliadyny. Nasiloną produkcją HLA-G i przeciwzapalnych cytokin, takich jak IL-10 i TGF- β , może powodować rekrutację limfocytów nabłonkowych, paradoksalnie powodując podtrzymanie zmian zapalnych w śluzówce przewodu pokarmowego [117]. U chorych z łuszczycą wykryto ekspresję HLA-G przez makrofagi w obrębie zmian łuszczycowych, w przeciwieństwie do makrofagów obecnych w zdrowym naskórku [3]. Może to wskazywać na mechanizm obronny, przeciwdziałający patologicznej aktywacji auto-reaktywnych limfocytów T, leżącej u podstaw tej choroby. Również w zmianach skórnych w przebiegu atopowego zapalenia skóry (AZS) wykryto obecność HLA-G, produkowanego jednakże głównie przez limfocyty T [54]. Proces zapalny w AZS przebiega z przewagą reakcji typu Th2 i zwiększoną produkcją IL-10, co może prowadzić do indukcji ekspresji HLA-G [56]. Autorzy sugerują, że produkcja HLA-G, podobnie jak w łuszczycy, może być wyrazem obronnego mechanizmu, zmierzającego do przywrócenia tolerancji immunologicznej i zahamowania aktywności zapalnej [122].

1.6.7. Znaczenie HLA-G w nieswoistych zapaleniach jelit

Do tej pory zostały przeprowadzone pojedyncze badania nad rolą i ekspresją HLA-G u chorych na nieswoiste zapalenia jelit. W jednym z badań oceniono biopaty pobrane w trakcie kolonoskopii z błony śluzowej jelita grubego u 43 pacjentów z NZJ pod kątem ekspresji HLA-G [115]. Wykryto obecność HLA-G w biopatach pobranych od wszystkich chorych z WZJG (badano 24 chorych), natomiast nie stwierdzono HLA-G w żadnym z materiałów pobranych od pacjentów z ChL-C, ani u osób z grupy kontrolnej [115]. Przy użyciu metod immunohistochemicznych wykazano, że antygen HLA-G znajduje się jedynie na powierzchni komórek nabłonka, a więc od strony zwróconej w stronę światła jelita [115]. Ponadto stwierdzono, że ekspresja i lokalizacja HLA-G były praktycznie identyczna w biopatach pobranych z aktywnych zmian zapalnych, jak i z niezmienionej błony śluzowej, nie stwierdzono również różnic zależnych od lokalizacji błony śluzowej lub przebiegu choroby u pacjenta. Nie wykazano produkcji HLA-G przez inne komórki błony śluzowej jelita, takie jak limfocyty, makrofagi czy komórki endotelium [115].

Ze względu na potwierdzone znaczenie przeciwzapalnej IL-10 zarówno w procesie zapalnym zachodzącym w przebiegu WZJG, jak i w stymulacji ekspresji HLA-G, autorzy zbadali przy użyciu metod immunohistochemicznych obecność IL-10 w biopatach, potwierdzając znaczącą produkcję IL-10 przez makrofagi i limfocyty T u pacjentów z WZJG [115]. Autorzy postulują, że zwiększona produkcja HLA-G w komórkach nabłonka, stymulowana przez sekrecję IL-10, ma działanie ochronne przed cytotoksycznością komórek NK, jednak niewystarczające do przełamania patomechanizmów prowadzących do uszkodzenia i destrukcji komórek [115]. Całkowity brak obecności HLA-G w biopatach pobranych od pacjentów z ChL-C oraz

grupy kontrolnej może być spowodowany brakiem nadmiernej sekrecji IL-10, typowej dla WZJG [115].

W innym badaniu autorzy skupili się na różnicach w wydzielaniu rozpuszczalnych izoform antygenu HLA-G przez PBMC u pacjentów z NZJ [89]. Próbkę krwi były pobrane od 37 pacjentów, w tym 20 z rozpoznaniem WZJG i 17 z ChL-C oraz od 30 zdrowych osób grupy kontrolnej. Następnie wyizolowano z pobranej krwi PBMC, które hodowano przez 48 godzin. Utworzono również hodowle inkubowane w obecności bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS) oraz, w przypadku PBMC uzyskanych od chorych z WZJG, do aktywowanych LPS dodano w hodowli rekombinowaną IL-10. Po 48 godzinnej inkubacji, oznaczono stężenie sHLA-G oraz IL-10 w badanych hodowlach. W przypadku PBMC nie poddanych stymulacji LPS, stwierdzono obecność sHLA-G w próbkach pobranych od pacjentów z ChL-C, natomiast nie stwierdzono sHLA-G w hodowlach PBMC pobranych od chorych z WZJG i grupy kontrolnej [89]. W hodowlach inkubowanych z bakteryjnym LPS oznaczono sHLA-G u osób z ChL-C i w grupie kontrolnej, lecz nie wykryto obecności sHLA-G w aktywowanych LPS hodowlach uzyskanych od chorych z WZJG. Dodanie rekombinowanej IL-10 do PBMC od pacjentów z WZJG inkubowanych z LPS przywróciło produkcję sHLA-G do poziomu porównywalnego z hodowlami PBMC aktywowanymi LPS, pobranymi od chorych z ChL-C i osób z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu IL-10 w hodowlach nieaktywowanych LPS, natomiast po dodaniu bakteryjnego LPS do PBMC odnotowano znacząco niższe stężenie IL-10 w aktywowanych hodowlach PBMC od pacjentów z WZJG w porównaniu do grupy kontrolnej i chorych z ChL-C [89]. Na podstawie tych badań autorzy postulują, że rozwój zmian zapalnych w WZJG może wynikać z niedostatecznego wydzielania IL-10 oraz HLA-G, przez co pozbawiony ich hamującego wpływu proces zapalny w błonie

śluzowej jelita grubego wymyka się spod kontroli układu immunologicznego i prowadzi do destrukcji tkanek oraz zmian makroskopowych [89]. Z kolei w przypadku ChL-C, wysoka ekspresja sHLA-G może być mechanizmem obronnym organizmu, mającym doprowadzić do zahamowania niekontrolowanego procesu zapalnego, jednak odmiennność zapalenia w ChL-C od innych chorób przewodu pokarmowego ma sprawiać, że jest ono niewrażliwe na hamowanie przez HLA-G.

Autorzy omawianego powyżej badania przeprowadzili następnie oznaczenie stężenia sHLA-G w hodowlach PBMC oraz w surowicy krwi u kolejnych 49 pacjentów, 27 chorych na WZJG oraz 22 chorych na ChL-C [131]. Wszyscy pacjenci, biorący udział w tym badaniu, byli w trakcie terapii immunosupresyjnej, w przeciwieństwie do chorych zakwalifikowanych do poprzedniego badania [131]. Stwierdzono znacznie niższe stężenia sHLA-G w hodowlach PBMC pobranych od chorych na ChL-C w trakcie immunosupresji niż obserwowane w hodowlach PBMC pobranych od chorych na ChL-C nie otrzymujących takiego leczenia [131]. Natomiast w przypadku hodowli PBMC pobranych od chorych na WZJG, stężenia sHLA-G były znacznie wyższe w hodowlach komórek pobranych od pacjentów otrzymujących leczenie immunosupresyjne [131]. Autorzy wykazali również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sHLA-G w hodowlach PBMC a stężeniem sHLA-G w surowicy krwi, zarówno u chorych na ChL-C, jak i na WZJG [131]. Należy zauważyć, że nie oceniano stężenia sHLA-G w surowicy u pacjentów z NZJ nie leczonych immunosupresyjnie [89]. Na podstawie uzyskanych wyników, autorzy postulują, że leczenie immunosupresyjne normalizuje produkcję sHLA-G w NZJ, poprzez obniżenie nadprodukcji tego antygenu u chorych na ChL-C oraz przywrócenie uwalniania sHLA-G u chorych na WZJG [131].

Sprzeczne wyniki powyższych badań czynią zagadnienie zachowania się i znaczenia antygeny HLA-G w NZJ przedmiotem zainteresowania niniejszych badań. Dokładniejsze poznanie zależności pomiędzy HLA-G oraz NZJ może przyczynić się do lepszego zrozumienia nie tylko patomechanizmów NZJ, ale także roli HLA-G w organizmie chorego. Powstaje również pytanie, czy różnice w ekspresji HLA-G, a w konsekwencji różnice w stężeniu sHLA-G obserwowanym w surowicy chorych na NZJ są na tyle istotne, by oznaczanie tego antygeny mogło znaleźć zastosowanie kliniczne w diagnostyce bądź monitorowaniu tej złożonej grupy chorób.

2. Cel pracy

W świetle przedstawionych informacji o patomechanizmie NZJ, postanowiono ustalić zależności pomiędzy aktywnością choroby a surowiczym stężeniem HLA-G.

Badań takich nie przeprowadzono dotąd u chorych na NZJ w populacji Polskiej.

Cel realizowano poprzez:

1. Ocenę zachowania się stężeń rozpuszczalnego antygenu HLA-G w surowicy krwi u chorych na chorobę Leśniowskiego – Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego,
2. Ustalenie zależności pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy a stopniem aktywności nieswoistych chorób zapalnych jelita oraz stosowanym leczeniem,
3. Określenie, czy oznaczanie w surowicy antygenu HLA-G może być potencjalnym markerem biochemicznym, pomocnym w różnicowaniu choroby Leśniowskiego – Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Do niniejszego prospektywnego badania zakwalifikowano 150 chorych, w tym 57 pacjentów z ChL-C i 51 z WZJG. Grupę kontrolną stanowiły 42 osoby z rozpoznanym ZJN. W grupie chorych na ChL-C było 29 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 19 do 68 lat (średnia 31,9). Grupę pacjentów z WZJG stanowiło 20 kobiet i 31 mężczyzn w wieku od 18 do 67 lat (średnia 35). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 30 kobiet i 12 mężczyzn w wieku od 18 do 69 lat (średnia 39). Charakterystykę badanych grup chorych przedstawiono w Tabeli 5 i 6.

Przyjęto następujące kryteria włączenia do badania: wiek powyżej 18 roku życia, rozpoznana ChL-C, WZJG lub ZJN, pisemna zgoda chorego na udział w badaniu.

Kryteriami wykluczającymi z badania były: brak zgody pacjenta na udział w badaniu, poważne choroby narządowe, choroby autoimmunologiczne, przewlekłe procesy zapalne, cukrzyca, choroby nowotworowe, leczenie przeciwciałami przeciw TNF- α .

Wszyscy pacjenci biorący udział w badaniu byli diagnozowani i leczeni w Oddziale Klinicznym Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (kierownik: prof. dr hab. Tomasz Mach). Projekt badań został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną UJ w Krakowie (nr KBET/137/B/2010). Wszyscy chorzy przed podpisaniem świadomej zgody na udział w badaniu zostali szczegółowo poinformowani o jego celu i metodach realizacji oraz związanym z badaniem ryzyku.

3.2. Kryteria rozpoznania i oceny ciężkości choroby Leśniowskiego-Crohna

ChL-C była rozpoznana na podstawie kryteriów klinicznych, endoskopowych, histologicznych, immunologicznych i obrazowych. Kryteria kliniczne ChL-C obejmowały: wywiad chorobowy, ze szczególnym uwzględnieniem dolegliwości bólowych w obrębie jamy brzusznej, zaburzeń rytmu oddawania stolca, obecności patologicznych domieszek w stolcu, gorączki, utraty masy ciała oraz obecności powikłań pozajelitowych [107]. W badaniu fizykalnym zwracano uwagę na bolesność palpacyjną, obecność badalnego oporu, zaburzeń perystaltyki, widocznych ujść przetok. Badanie to pozwalało nie tylko na ocenę obecności patologii w jamie brzusznej, ale również na rozpoznanie i ocenę występowania zmian pozajelitowych.

W rozpoznaniu ChL-C uwzględniano także badania obrazowe. Wszyscy chorzy zakwalifikowani do grupy ChL-C mieli wcześniej wykonane badania radiologiczne, takie jak pasaż jelita cienkiego, tomografię komputerową lub rezonans magnetyczny jamy brzusznej celem potwierdzenia obecności zmian typowych dla tej choroby, ich lokalizacji i powikłań. U chorych z ChL-C oznaczano obecność autoprzeciwciał przeciw *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) w surowicy krwi.

Chorzy kwalifikowani do badania mieli wykonaną kolonoskopię. Ze względu na różną lokalizację zmian zapalnych w ChL-C, które mogą znajdować się w dowolnym odcinku przewodu pokarmowego, w tym w jelicie cienkim, nie u wszystkich chorych istniała możliwość uwidocznienia zmian zapalnych w badaniu endoskopowym i pobrania wycinków do badania histopatologicznego. U tych chorych, u których było możliwe wykonanie kolonoskopii, obraz histopatologiczny bioptatów błony śluzowej stanowił istotne kryterium diagnostyczne [52].

Stopień aktywności ChL-C oceniano na podstawie wskaźnika Crohn's Disease Activity Index (CDAI) wyliczonego w momencie włączenia pacjenta do badania,

uwzględniając także ostatnie europejskie zalecenia opracowane przez European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) w 2010 r. [123]. Przy obliczaniu CDAI brano pod uwagę dolegliwości pacjenta występujące w okresie siedmiu poprzedzających ocenę dni, w tym ilość wypróżnień, obecność lub brak dolegliwości bólowych, ogólne samopoczucie, a także obecność pozajelitowych manifestacji ChL-C, odchylenia w badaniu fizykalnym, hematokryt oraz stopień odżywienia chorego (Tab.1).

Tabela 1. Wskaźnik aktywności ChL-C (CDAI) [123]

Dane kliniczne lub laboratoryjne		Mnożnik
1	Liczba płynnych lub luźnych stolców (każdy dzień z ostatnich 7 dni)	x 2
2	Ból brzucha (0 = brak, 1 = łagodny, 2 = umiarkowany 3 = silny)	x 5
3	Ogólne samopoczucie (0 = ogólnie dobre, 1 = nieco poniżej normy, 2 = słabe, 3 = bardzo słabe, 4 = bardzo złe)	x 7
4	Manifestacje pozajelitowe (bóle stawów/zapalenie stawów, zapalenie tęczówki lub naczyńówki, rumień guzowaty, zgorzelinowe zapalenie skóry, afty w jamie ustnej, szczelina odbytu, przetoka lub ropień, inna przetoka, gorączka powyżej 37,8° C w ostatnim tygodniu)	x 20
5	Badalny guz w jamie brzusznej (0 = nie, 2 = wątpliwy, 5 = pewny)	x 10
6	Stosowanie leków przeciwbiegunkowych (loperamid) (0 = nie, 1 = tak)	x 30
7	Hematokryt (norma – aktualny hematokryt, dla mężczyzn norma=47%, dla kobiet norma=42%)	x 6
8	Procentowe odchylenie od prawidłowej masy ciała	x 1
CDAI = Suma punktów		

Wynik CDAI poniżej 150 punktów jest uznawany za remisję choroby. Zaostrzenie lekkiego stopnia rozpoznajemy, gdy CDAI wynosi pomiędzy 150 a 220 punktów, średniego stopnia od 220 do 450 punktów, natomiast w ciężkim rzucie choroby CDAI przekracza 450 punktów [123].

3.3. Kryteria rozpoznania i oceny ciężkości wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

WZJG rozpoznawane było na podstawie kryteriów klinicznych, endoskopowych, histopatologicznych, immunologicznych i obrazowych. W

rozpoznanie tej choroby wywiad oraz badanie fizykalne mają duże znaczenie, a z badań dodatkowych podstawową rolę posiada kolonoskopia. Wszyscy zakwalifikowani do badania mieli uprzednio wykonany ten zabieg. Ze względu na ograniczenie lokalizacji zmian zapalnych w WZJG do jelita grubego, rzadko tylko w jelicie cienkim, ocena makroskopowa zmian w błonie śluzowej jelita oraz badanie histopatologiczne wycinków miały pierwszorzędne znaczenie dla postawienia rozpoznania tej choroby.

Aktywność WZJG oceniano na podstawie Klasyfikacji Montrealskiej i wytycznych ECCO z 2010 r. [51]. Klasyfikacja ta uwzględnia nasilenie biegunki, obecność krwi w stolcu oraz ogólnoustrojowe objawy zaostrzenia, takie jak przyspieszenie akcji serca, gorączka, niedokrwistość, CRP w surowicy krwi (Tab.2,3).

Tabela 2. Klasyfikacja Montrealska rozległości WZJG [51]

Stopień	Rozległość zmian
E1	Zapalenie odbytnicy - zmiany ograniczone do odbytnicy
E2	Zapalenie lewej połowy okrężnicy - zmiany zlokalizowane dystalnie od zagięcia śledzionowego
E3	Rozległe zapalenie okrężnicy - zmiany zlokalizowane proksymalnie od zagięcia śledzionowego

Tabela 3. Skala aktywności WZJG wg ECCO [51]

Stopień ciężkości zaostrzenia	Objawy
Remisja	Bez objawów
Łagodne	<4 stolców/dobę, tętno <90/min, temperatura <37,5°C, stężenie hemoglobiny >11,5 g/dl, CRP w normie
Umiarkowane	>4 stolców/dobę, tętno <90/min, temperatura <37,8°C, stężenie hemoglobiny >10,5 g/dl, CRP <30
Ciężkie	≥6 stolców/dobę, akcja serca >90/min, temperatura ≥37,8°C, stężenie hemoglobiny <10,5 g/dl, CRP ≥30 mg/l

3.4. Kryteria rozpoznania zespołu jelita nadwrażliwego

ZJN rozpoznawany był na podstawie tzw. Kryteriów Rzymskich III [38]. Kryteria te obejmują charakterystyczny ból lub dyskomfort (określany jako przewlekłe nieprzyjemne odczucie, nie będące bólem) w jamie brzusznej przez co najmniej 3 dni w miesiącu przez ostatnie 3 trzy miesiące, które dodatkowo spełnią dwa z trzech poniższych warunków:

4. Ból lub dyskomfort ustępuje lub zmniejsza się po wypróżnieniu,
5. Początek dolegliwości związany jest ze zmianą częstości wypróżnień,
6. Początek dolegliwości wiąże się ze zmianą charakteru stolca.

W rozpoznawaniu ZJN istotne jest wykluczenie organicznych przyczyn dolegliwości i szczególnie tzw. objawów alarmowych, do których należą: bóle nocne, spadek masy ciała, krew w stolcu, niedokrwistość. Wszyscy chorzy z rozpoznaniem ZJN zakwalifikowani do badania mieli wykonane badania obrazowe, takie jak radiologiczny pasaż jelita cienkiego lub tomografię komputerową, oraz badania endoskopowe (kolonoskopię i gastrokopię) z pobraniem wycinków z błony śluzowej do badania histopatologicznego, celem wykluczenia zmian patologicznych. Oznaczano również obecność autoprzeciwciał ASCA i ANCA w surowicy krwi. Takie postępowanie wynikało z faktu, że rozpoznanie ZJN można postawić po wykluczeniu innych chorób, między innymi NZJ. ZJN należy bowiem do zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego i poza tzw. poinfekcyjnym ZJN, w którym może występować przewlekły naciek zapalny w jelicie grubym, nie stwierdza się organicznych patologii lub nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych [38]. Z tych względów chorzy z ZJN zostali wybrani do grupy kontrolnej w niniejszym badaniu.

3.5. Badania morfologiczne i biochemiczne krwi

Krew do badań analitycznych była pobierana u chorych na czczo, w godzinach porannych, przy użyciu zestawów próżniowych do pobrań Sarstedt Monovette. Badania obejmowały następujące parametry hematologiczne krwi obwodowej: liczba leukocytów (WBC), erytrocytów (RBC), płytek krwi (PLT), stężenie hemoglobiny (Hb), hematokryt (Hct). Badania biochemiczne obejmowały: stężenie albumin, białka całkowitego, żelaza oraz białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi. Morfologia krwi była oznaczana przy pomocy analizatora automatycznego Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Japonia). Badania biochemiczne wykonywane były analizatorem automatycznym Roche-Cobas 6000 (Roche Diagnostic, Szwajcaria). Wszystkie powyższe badania analityczne były wykonane w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (kierownik: dr n. med. Barbara Maziarz).

Tabela 4. Wartości referencyjne badań biochemicznych i morfologii krwi

Badania biochemiczne		Badania morfologii krwi	
Oznaczenie w surowicy	Wartości referencyjne	Oznaczenie	Wartości referencyjne
Albumina	[35 – 50] g/l	WBC (leukocyty)	[4 – 10] $\times 10^3/\mu\text{l}$
Białko całkowite	[64 – 83] g/l	RBC (erytrocyty)	[3,5 – 6,5] $\times 10^6/\mu\text{l}$
Żelazo	K [7.2 – 25.9] $\mu\text{mol/l}$ M [10,6 – 28,3] $\mu\text{mol/l}$	Hct	K [35 – 47] % M [37 – 54] %
CRP	<5 mg/l	Hb	[11 – 17] g/dl
		PLT (płytki krwi)	[125 – 340] $\times 10^3/\mu\text{l}$

3.6. Badanie stężenia sHLA-G w surowicy

Krew do oznaczenia stężenia sHLA-G była pobierana u chorych na czczo, w godzinach porannych, przy użyciu zestawów próżniowych do pobrań z EDTA (Sarstedt Monovette). Następnie krew była wirowana przy 2000g przez 10 minut i supernatant zbierano do próbek polietylenowych. Surowicę ponownie wirowano przy 16000g

przez 15 minut celem oddzielenia płytek krwi. Supernatant po drugim wirowaniu przenoszono do próbek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml, zamrażano i przechowywano temperaturze -70°C do momentu wykonania oznaczeń.

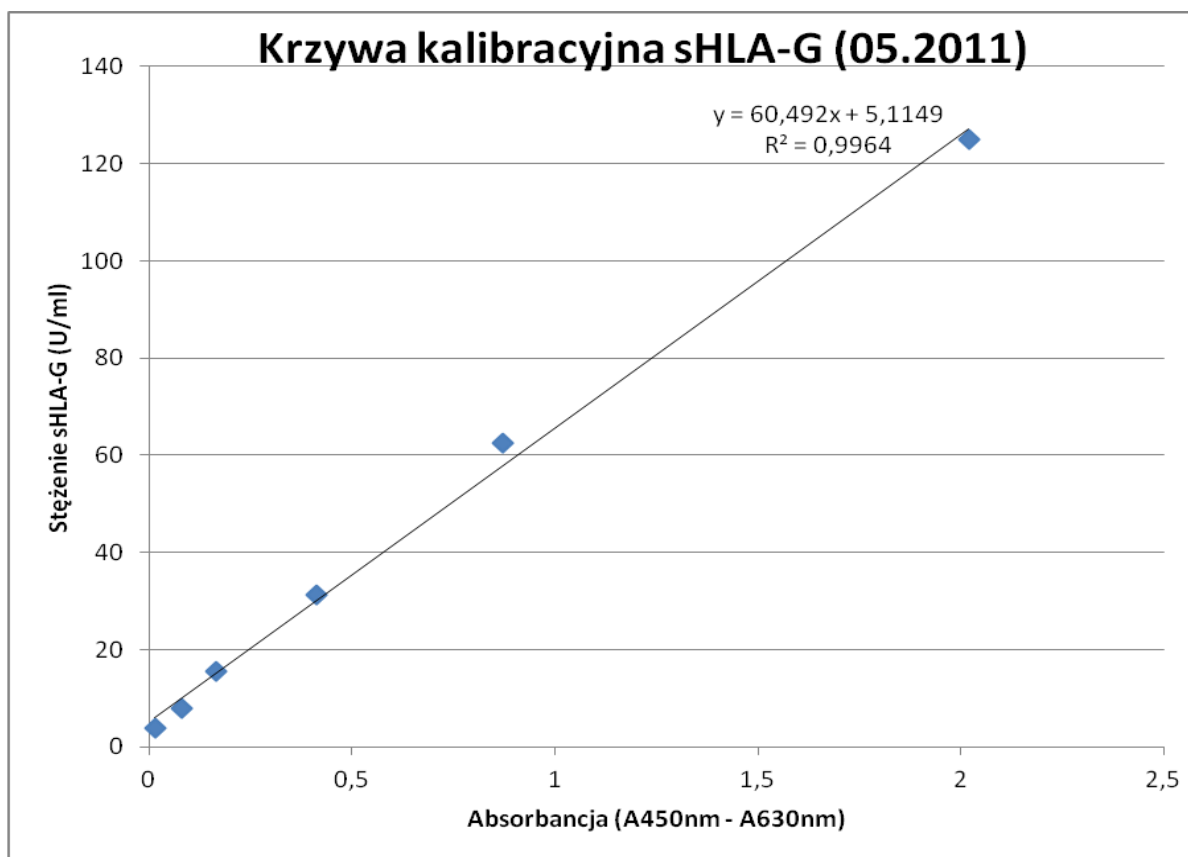
Stężenie sHLA-G było oznaczane przy użyciu metody kanapkowej ELISA (BioVendor, Czechy) w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (kierownik prof. dr hab. Adam Dubin) przy użyciu czytnika ELISA model Power Wave X Select (Bio-Tek Instruments, USA). Oznaczenia wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta metody. Przed przystąpieniem do oznaczenia odtwarzano główny kalibrator poprzez rozpuszczenie liofilizatu w wodzie destylowanej, uzyskując roztwór sHLA-G o stężeniu 625 U/ml. Następnie poprzez jego rozcieńczanie przygotowywano zestaw roztworów kalibracyjnych o stężeniach 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 oraz 3,91 U/ml. Przygotowywano również roztwór sprzęgający, poprzez stukrotne rozcieńczenie koncentratu roztworu sprzęgającego dostarczonym w zestawie rozpuszczalnikiem, oraz roztwór do przemywania, przez dziesięciokrotne rozcieńczenie koncentratu w wodzie destylowanej.

Po rozmrożeniu próbek surowicy, w temperaturze pokojowej nanoszono 100 μl roztworów kalibrujących, badanych surowic i roztworu rozcieńczającego (służący jako kontrola ujemna) do odpowiednich dołków na płytce. Inkubowano płytkę w temperaturze 4°C przez 16 godzin. Następnie pięciokrotnie przemywano dołki roztworem do przemywania (0,35 ml roztworu na dołek). Po ostatnim płukaniu płytkę osuszano przy użyciu papierowego ręcznika, dodawano do dołków 100 μl roztworu sprzęgającego i inkubowano w temperaturze 25°C przez godzinę w kołowej wytrząsarce do mikropłytek przy 300 cykli na minutę, po czym ponownie pięciokrotnie przemywano dołki roztworem do przemywania. Następnie dodawano po 100 μl

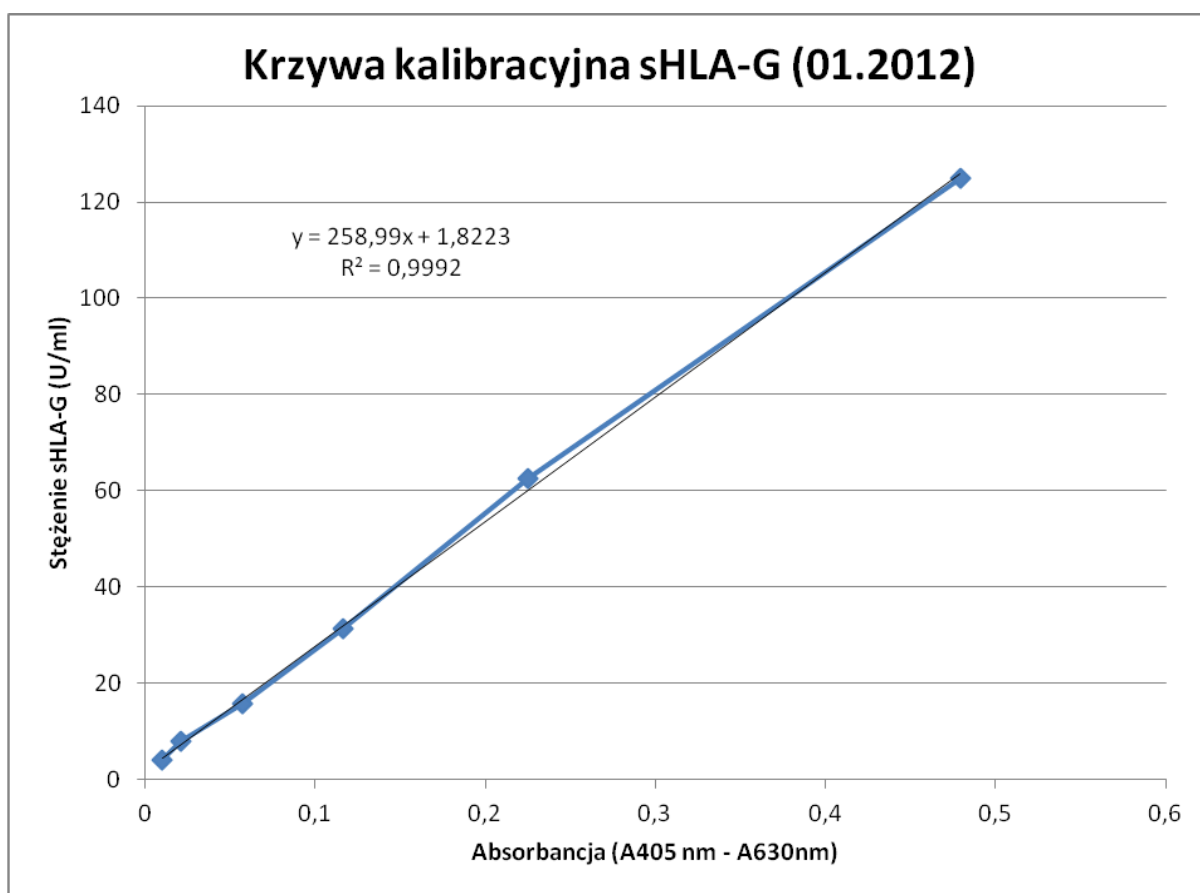
roztworu odczynnika i inkubowano przez 25 minut w temperaturze 25°C. Po upływie wyznaczonego czasu przerywano reakcję barwiącą poprzez dodanie do każdego dołka 100 µl roztworu kończącego.

Odczyt absorbancji wykonywano przy długości fali 450nm i 650nm po 5 minutach od zatrzymania reakcji. Krzywe kalibracyjne uzyskano poprzez naniesienie na wykres średniej wartości absorbancji zestawu kalibratorów o znanych stężeniach sHLA-G. Krzywe kalibracyjne wyliczone w momencie przeprowadzenia testu ELISA, tzn. w maju 2011 i styczniu 2012, przedstawiają ryciny 1 i 2.

Czułość zastosowanej metody, definiowana jako najmniejsze stężenie badanej substancji dające absorbancję wyższą niż średnia absorbancja dołków kontroli ujemnej +3 odchylenia standardowe, wynosiła 3 U/ml.



Rycina 1. Krzywa kalibracyjna sHLA-G, oznaczenie z maja 2011 r.



Rycina 2. Krzywa kalibracyjna sHLA-G, oznaczenie ze stycznia 2012 r.

3.7 Metody statystyczne

Wyniki badań klinicznych i laboratoryjnych zgromadzono w arkuszu kalkulacyjnym Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA, licencja na użytkowanie oprogramowania dla UJ-CM). Analizę statystyczną zebranego materiału przeprowadzono przy użyciu programu Statistica wersja 10.0 (StatSoft, Inc., USA, licencja na użytkowanie oprogramowania dla UJ-CM).

Wyniki początkowo opracowano przy użyciu statystyki opisowej. Badano rozkłady analizowanych zmiennych i przedstawiono je w postaci tabel i rycin. Zmienne jakościowe przedstawiono jako proporcje, natomiast zmienne ilościowe opisano przy użyciu parametrów statystycznych, takich jak średnia arytmetyczna z odchyleniem standardowym (SD) i mediana.

Zgodność rozkładu analizowanych zmiennych z rozkładem normalnym sprawdzano testem Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładów normalnych znamienności statystyczne między badanymi próbami oceniano testem t-Studenta. Dla zmiennych o rozkładzie odbiegającym od normalnego zastosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya.

Przeprowadzono również badanie zależności pomiędzy badanymi parametrami przy pomocy współczynnika korelacji Spearmana. Przy testowaniu hipotez przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$. We wszystkich testach za poziom istotności statystycznej różnic przyjęto prawdopodobieństwo p mniejsze od przyjętego poziomu istotności ($p < 0,05$) [81].

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka badanych grup

Grupę chorych na ChL-C stanowiło 57 osób, 29 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 19 do 68 lat (średnia 31,9). Charakterystykę badanych grup chorych przedstawiono w tabelach 5 i 6. Większość pacjentów (34 osoby) w momencie kwalifikacji do badania pozostawała w fazie remisji choroby, u 18 chorych rozpoznano lekkie zaostrzenie ChL-C, natomiast 5 pacjentów spełniało kryteria rozpoznania zaostrzenia ChL-C o umiarkowanym nasileniu. Średni czas od rozpoznania ChL-C wynosił 4,3 lata. W grupie z ChL-C było 18 chorych zakwalifikowanych do badania podczas pierwszej hospitalizacji, w trakcie której postawiono ostateczne rozpoznanie. Stosunkowo duża grupa chorych, 22 osoby (38%), prezentowała aktywne powikłania przewlekłego procesu zapalnego, takie jak ropnie lub przetoki, natomiast 23 pacjentów było w przeszłości operowanych z powodu powikłań ChL-C (Tab.6). W grupie chorych na ChL-C było 15 palaczy papierosów (Tab.5).

Większość chorych na ChL-C (34 osoby) było leczonych tylko preparatami mesalazyny lub sulfasalazyny. Pozostali pacjenci otrzymywali leczenie immunosupresyjne w momencie kwalifikacji do badania, 18 chorych stosowało glikokortykosteroidy, a 9 osób było leczonych azatiopryną (Tab.6).

Tabela 5. Charakterystyka badanych grup chorych

	ChL-C	WZJG	Kontrola
Liczebność	57	51	42
Kobiety [n(%)]	29 (51%)	20 (39%)	30 (71%)
Mężczyźni [n(%)]	28 (49%)	31 (61%)	12 (29%)
Wiek (lata;średnia±SD)	31,9±9,6	35±13,2	39±4,2
Palenie papierosów [n(%)]	15 (26%)	7 (14%)	11 (26%)

Lokalizację zmian zapalnych wśród chorych na ChL-C przedstawia Tabela 7. Przeważająca liczba pacjentów prezentowała aktywne zmiany zapalne w obrębie jelita cienkiego (35 osób;61%) oraz w obrębie jelita cienkiego i grubego (18 osób;31%). Jedynie 4 chorych miało postać choroby ograniczoną do jelita grubego.

Tabela 6. Charakterystyka chorych z ChL-C i WZJG

	ChL-C	WZJG
Stopień ciężkości choroby:		
- remisja	34	25
- lekki	18	19
-średni	5	7
Czas trwania choroby (lata;średnia±SD)	4,3±4,2	6,7±6,8
Powikłania procesu zapalnego (ropnie, przetoki, n)	22	
Przebycie zabiegu operacyjnego (n)	23	
Stosowane leki (n):		
- mesalazyna/sulfasalazyna	34	31
- glikokortykosteroidy	18	16
- azatiopryna	9	5

Tabela 7. Lokalizacja zmian zapalnych w jelitach u chorych na chorobę
Leśniowskiego – Crohna

Lokalizacja zmian zapalnych	Liczba chorych
Zmiany w jelicie cienkim	35 (61%)
Zmiany w jelicie grubym	4 (8%)
Zmiany w jelicie cienkim i w jelicie grubym	18 (31%)

Do grupy chorych na WZJG zakwalifikowano 51 osób, w tym 20 kobiet i 31 mężczyzn w wieku od 18 do 69 lat (średnia 35) (Tab.5). W tej grupie było 25 chorych w fazie remisji. W momencie kwalifikacji do badania 19 pacjentów prezentowało objawy zaostrzenia lekkiego stopnia, natomiast 7 osób miało dolegliwości kwalifikujące ich do rozpoznania zaostrzenia średniego stopnia. Średni czas od rozpoznania WZJG wynosił 6,7 lat. 13 chorym zaproponowano udział w badaniu wkrótce po postawieniu rozpoznania (Tab.6). W grupie chorych na WZJG znalazło się 7 palaczy papierosów (Tab.5).

Spośród chorych na WZJG, w momencie włączenia do badania, było 31 pacjentów leczonych tylko preparatami mesalazyny lub sulfasalazyny. Pozostali chorzy byli w trakcie terapii lekami immunosupresyjnymi, 19 pacjentów było leczonych glikokortykosteroidami, natomiast 7 otrzymywało preparaty azatiopryny (Tab.6).

Rozległość zmian zapalnych w jelicie grubym u chorych na WZJG przedstawia Tabela 8. Największy stopień zajęcia procesem chorobowym, czyli zmiany zapalne poza zagięciem śledzionowym, w prawej części okrężnicy, stwierdzono u 18 chorych (35%). Cechy WZJG ograniczone do odbytnicy obserwowano u 11 pacjentów (21%), natomiast pozostałych 22 chorych (44%) miało zmiany zapalne w dystalnym odcinku jelita grubego, czyli w zakresie esicy i zstępnicy.

Tabela 8. Rozległość zmian we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

Rozległość zmian zapalnych	Liczba chorych
Zmiany w obrębie odbytnicy	11 (21%)
Zmiany do zagięcia śledzionowego	22 (44%)
Zmiany poza zagięciem śledzionowym	18 (35%)

Grupę kontrolną stanowiło 42 pacjentów z rozpoznaniem ZJN, w tym było 30 kobiet i 12 mężczyzn w wieku od 18 do 69 lat (średnia 39). W tej grupie było 11 osób palących papierosy (Tab.5).

4.2. Wyniki badań analitycznych

Tabela 9. Wyniki badań analitycznych w badanych grupach chorych.

Parametr biochemiczny	ChL-C		WZJG		ZJN
	Zaostrzenie	Remisja	Zaostrzenie	Remisja	
Leukocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,7 $\pm$ 2,8	7,3 $\pm$ 3	10 $\pm$ 5,8	6,1 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 1,3
Erytrocyty ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	4,67 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,7	5 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,4
Hemoglobina (g/dl)	12,2 $\pm$ 0,6	12,8 $\pm$ 1,9	12,7 $\pm$ 2,3	14,1 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1,3
Hematokryt (%)	38,1 $\pm$ 4,3	39 $\pm$ 4,7	39,1 $\pm$ 5,4	42,2 $\pm$ 5	41,8 $\pm$ 3,4
Płytki krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	380 $\pm$ 207	304 $\pm$ 106	370 $\pm$ 233	248 $\pm$ 59	246 $\pm$ 44
Albumina (g/l)	39,1 $\pm$ 5,8	42,2 $\pm$ 5,4	40 $\pm$ 6,5	45,3 $\pm$ 4	46 $\pm$ 3,4
Białko całkow. (g/l)	70 $\pm$ 8,5	71,4 $\pm$ 7,5	69,5 $\pm$ 10,2	75 $\pm$ 4,5	73,3 $\pm$ 4,8
Żelazo ($\mu\text{mol/l}$)	10,2 $\pm$ 7,2	11,7 $\pm$ 8,6	11,5 $\pm$ 8	18,2 $\pm$ 9,2	19,2 $\pm$ 7,2
CRP (mg/l)	22,5 $\pm$ 30,3	9 $\pm$ 10,4	20 $\pm$ 27,6	5,9 $\pm$ 5,9	4,1 $\pm$ 2,5

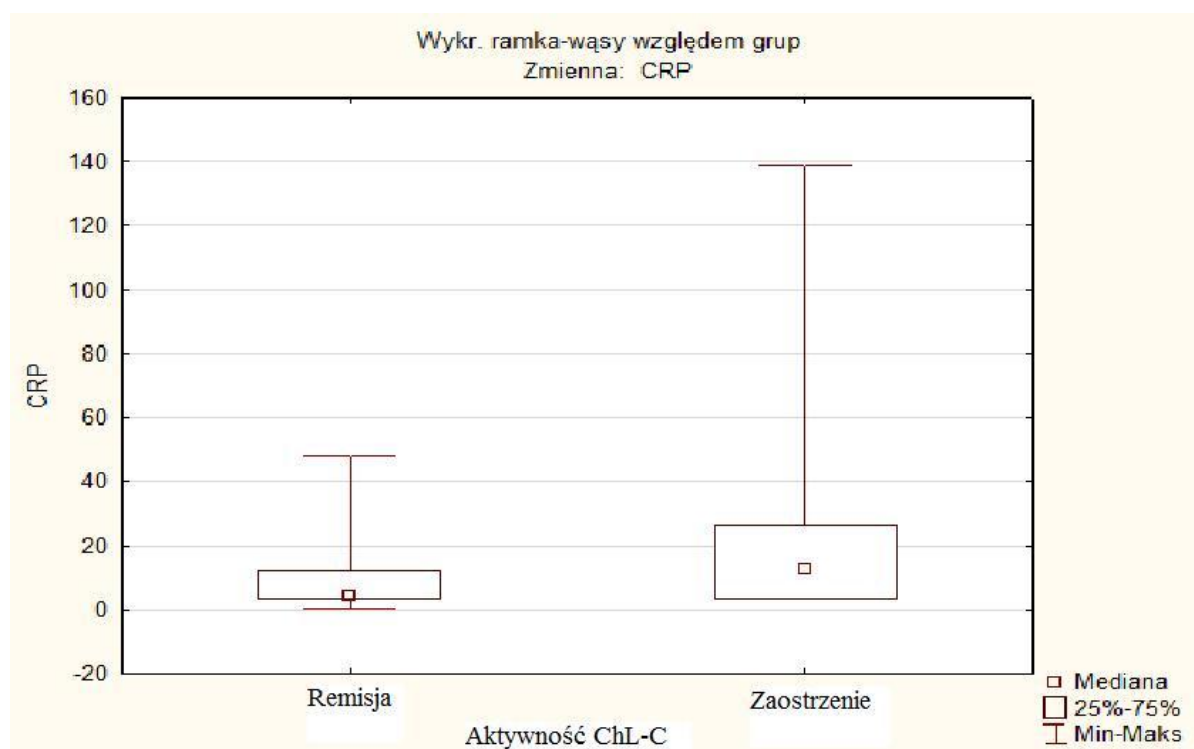
Objaśnienia: średnia $\pm$ odchylenie standardowe

W Tabeli 9 przedstawiono zebrane wyniki badań morfologicznych oraz biochemicznych krwi w badanych grupach chorych. Grupy pacjentów z ChL-C oraz WZJG dodatkowo podzielono ze względu na stopień aktywności choroby w momencie

pobrania krwi do badań na grupę chorych w remisji i grupę chorych z aktywną postacią choroby.

4.2.1. Wyniki badań analitycznych w grupie chorych na ChL-C

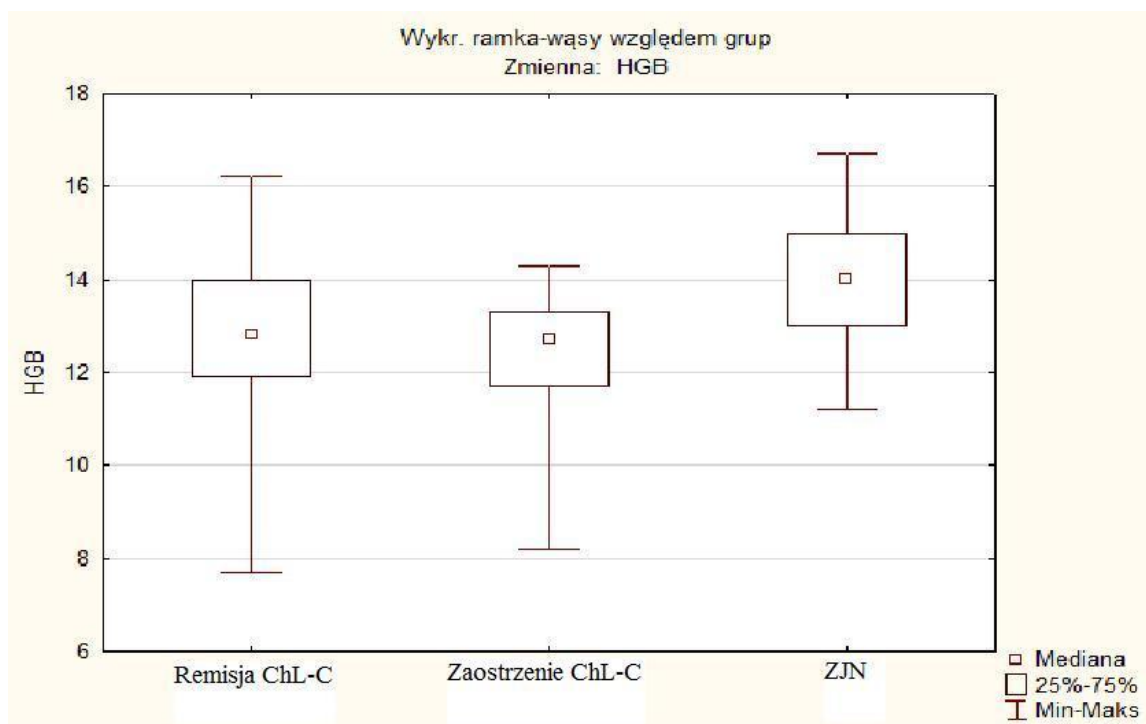
Nie wykazano istotnych statystycznie różnic badanych parametrów biochemicznych i morfologicznych pomiędzy chorymi w fazie zaostrzenia i remisji ChL-C, z wyjątkiem stężenia CRP w surowicy. CRP wynosiło odpowiednio $22,5 \pm 30,3$ mg/l w okresie zaostrzenia i $9 \pm 10,4$ mg/l w okresie remisji choroby ($p=0,049$) (Tab.9, Ryc.3).



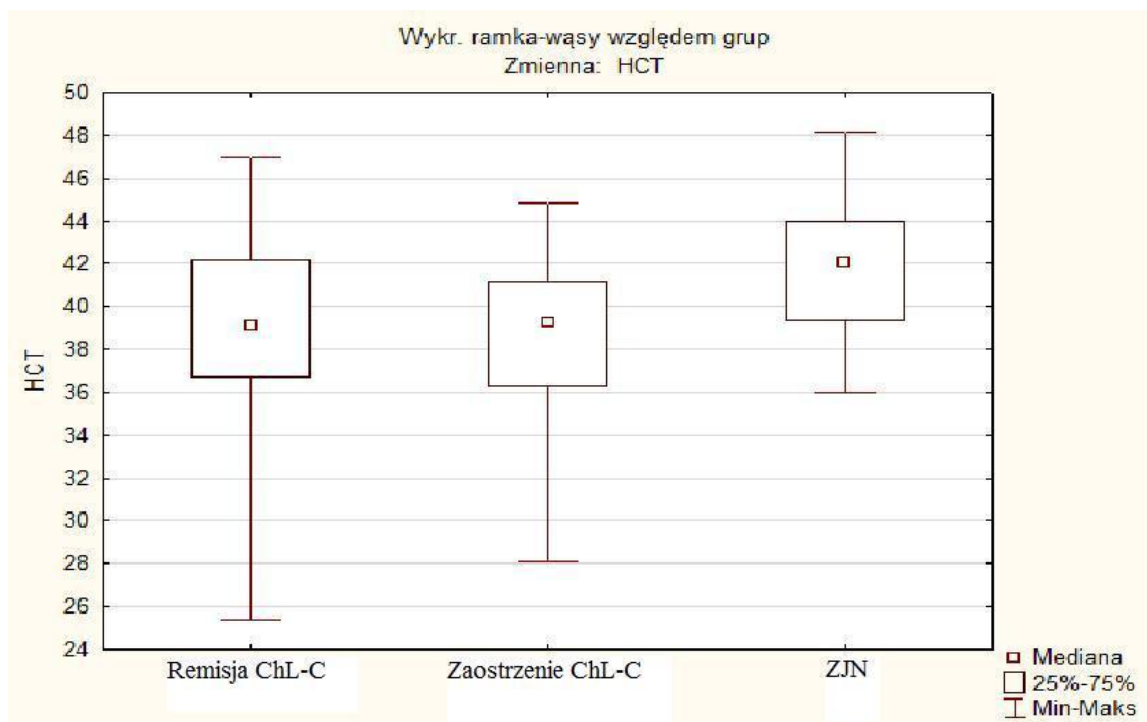
Rycina 3. Stężenie CRP (mg/l) w surowicy chorych na ChL-C w fazie zaostrzenia i remisji

Zaobserwowano natomiast znaczne różnice zarówno w morfologii krwi, jak i pozostałych parametrów biochemicznych pomiędzy pacjentami z ChL-C w fazie zaostrzenia oraz remisji a grupą kontrolną. Średnie stężenie hemoglobiny w grupie chorych z aktywną ChL-C wynosiło 12,2 g/dl, w grupie kontrolnej 14 g/dl ($p=0,001$).

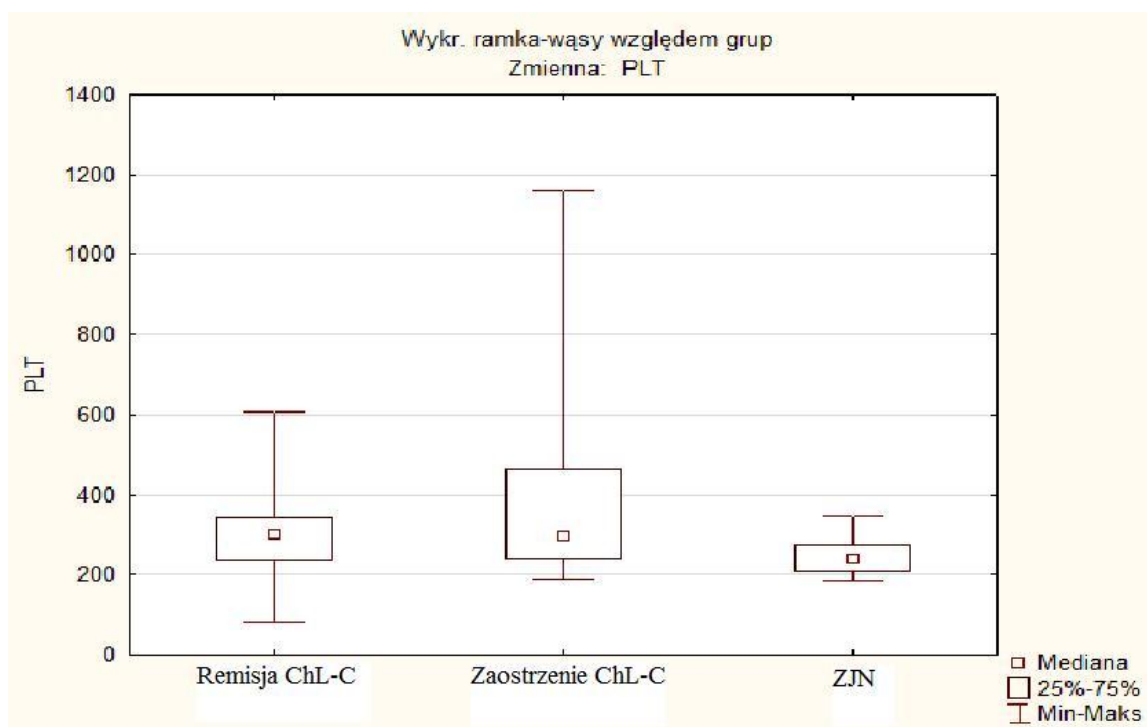
Wśród pacjentów w fazie remisji ChL-C stwierdzono średnie stężenie hemoglobiny 12,8 g/dl ($p=0,003$ względem grupy kontrolnej) (Tab.9, Ryc.4). Podobne zależności stwierdzono w przypadku hematokrytu, a mianowicie w zaostrzeniu ChL-C 38,1% w remisji ChL-C 39%, zaś w grupie kontrolnej 41,8% ($p=0,001$ zaostrzenie vs kontrola, $p=0,01$ remisja vs kontrola) (Ryc.5). Liczba płytek krwi w zaostrzeniu ChL-C wynosiła $380 \times 10^3/\mu\text{l}$, w remisji ChL-C $304 \times 10^3/\mu\text{l}$, w grupie kontrolnej $246 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($p=0,0005$ zaostrzenie vs kontrola, $p=0,006$ remisja vs kontrola) (Ryc.6). Stężenie albumin w zaostrzeniu ChL-C wynosiło 39,1 g/l, w remisji ChL-C 42,2 g/l, zaś w grupie kontrolnej 46 g/l ($p=0,001$ zaostrzenie vs kontrola, $p=0,002$ remisja vs kontrola) (Ryc.7). Stężenie żelaza w zaostrzeniu ChL-C wynosiło 10,2 $\mu\text{mol/l}$, zaś w remisji ChL-C 11,7 $\mu\text{mol/l}$, a w grupie kontrolnej 19,2 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,001$ zaostrzenie vs kontrola, $p=0,001$ remisja vs kontrola) (Tab.9, Ryc.8).



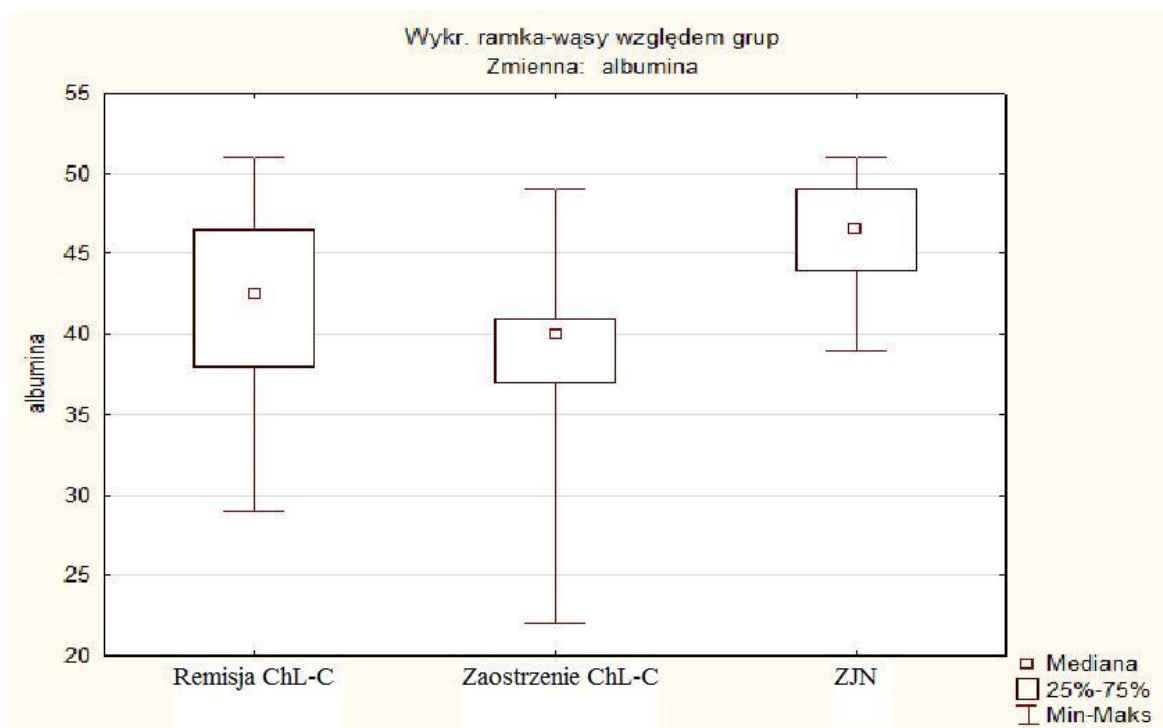
Rycina 4. Stężenie hemoglobiny (g/dl) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



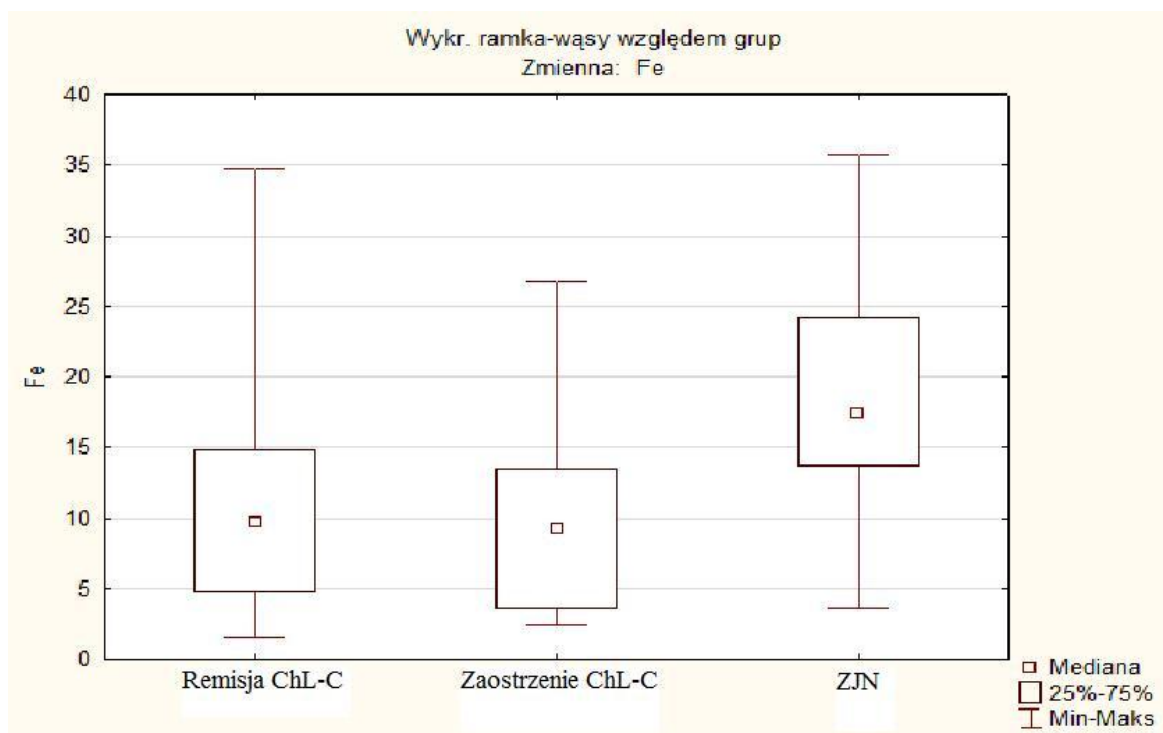
Rycina 5. Hematokryt (%) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



Rycina 6. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



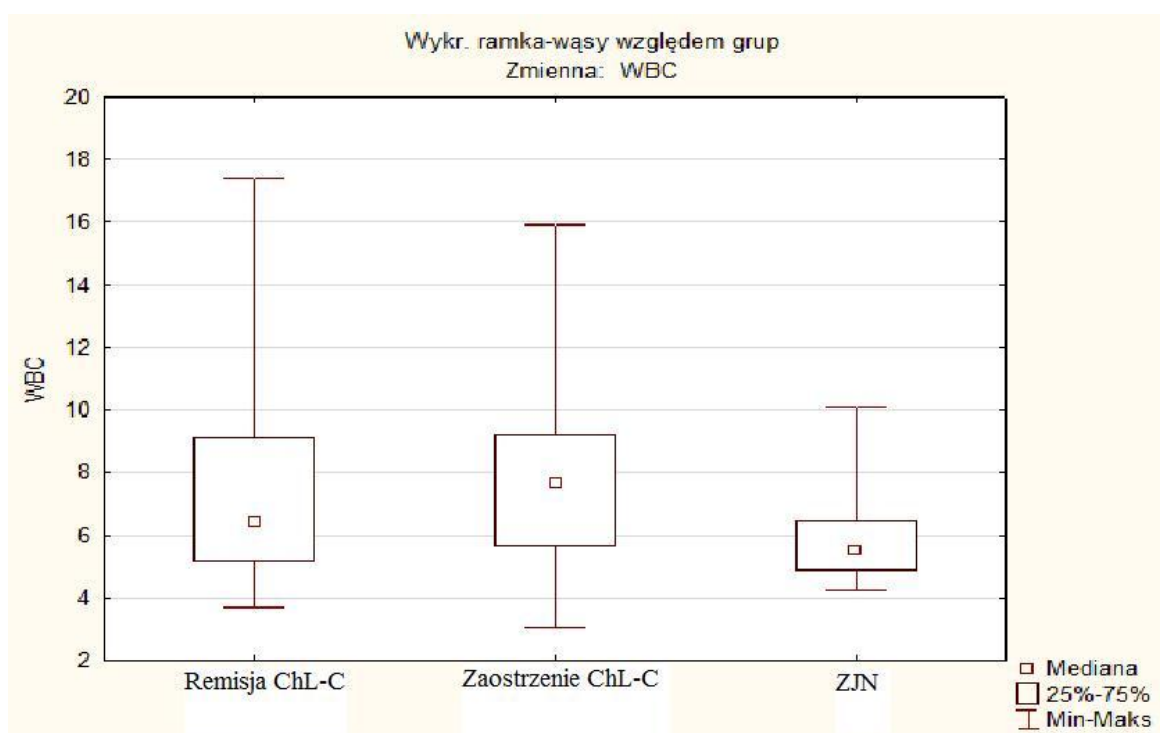
Rycina 7. Stężenie albumin (g/l) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



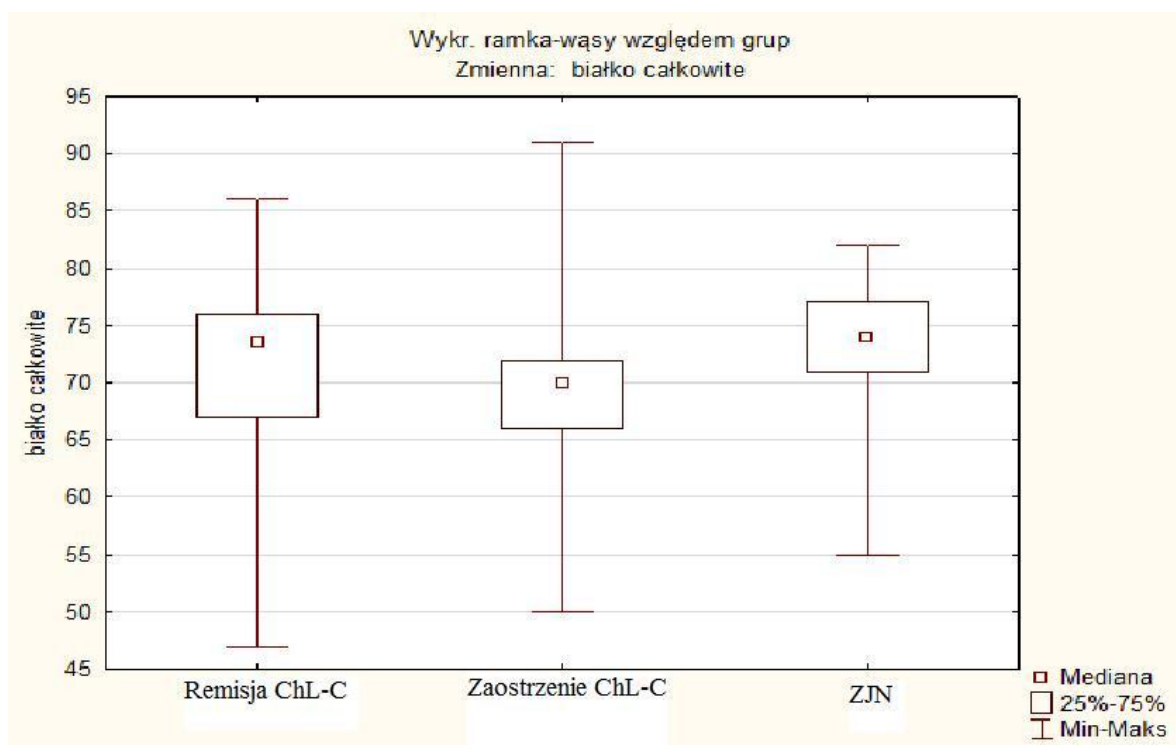
Rycina 8. Stężenie żelaza (μmol/l) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Chorzy w aktywnej fazie ChL-C charakteryzowali się w porównaniu do grupy kontrolnej istotnie wyższym poziomem leukocytów, $7,7 \times 10^3 / \mu\text{l}$ dla chorych z ChL-C i

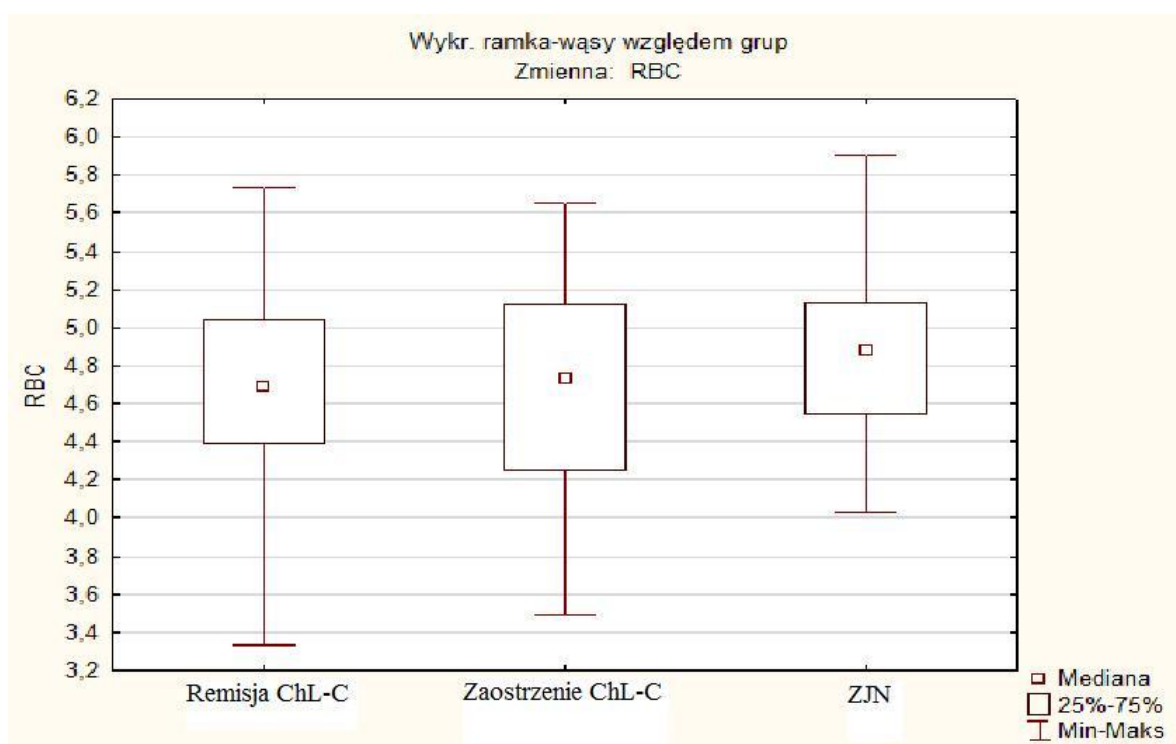
5,9 $\times 10^3/\mu\text{l}$ dla osób z grupy kontrolnej ($p=0,004$). Nie wykazano natomiast statystycznie istotnej różnicy w liczbie leukocytów pomiędzy pacjentami w remisji ChL-C z grupą kontrolną ($p=0,6$) (Ryc.9). Również w przypadku stężenia białka całkowitego zanotowano znaczące różnice pomiędzy chorymi w trakcie zaostrzenia ChL-C a grupą kontrolną (odpowiednio, 70 g/l vs 73,3 g/l, $p= 0,015$), natomiast nie stwierdzono różnic tego parametru pomiędzy pacjentami w fazie remisji ChL-C i grupą kontrolną ($p=0,31$) (Ryc.10). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w liczbie erytrocytów we krwi u chorych na ChL-C, niezależnie od nasilenia choroby, a grupą kontrolną (Tab.9, Ryc.11).



Rycina 9. Liczba leukocytów ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



Rycina 10. Stężenie białka całkowitego (g/l) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej



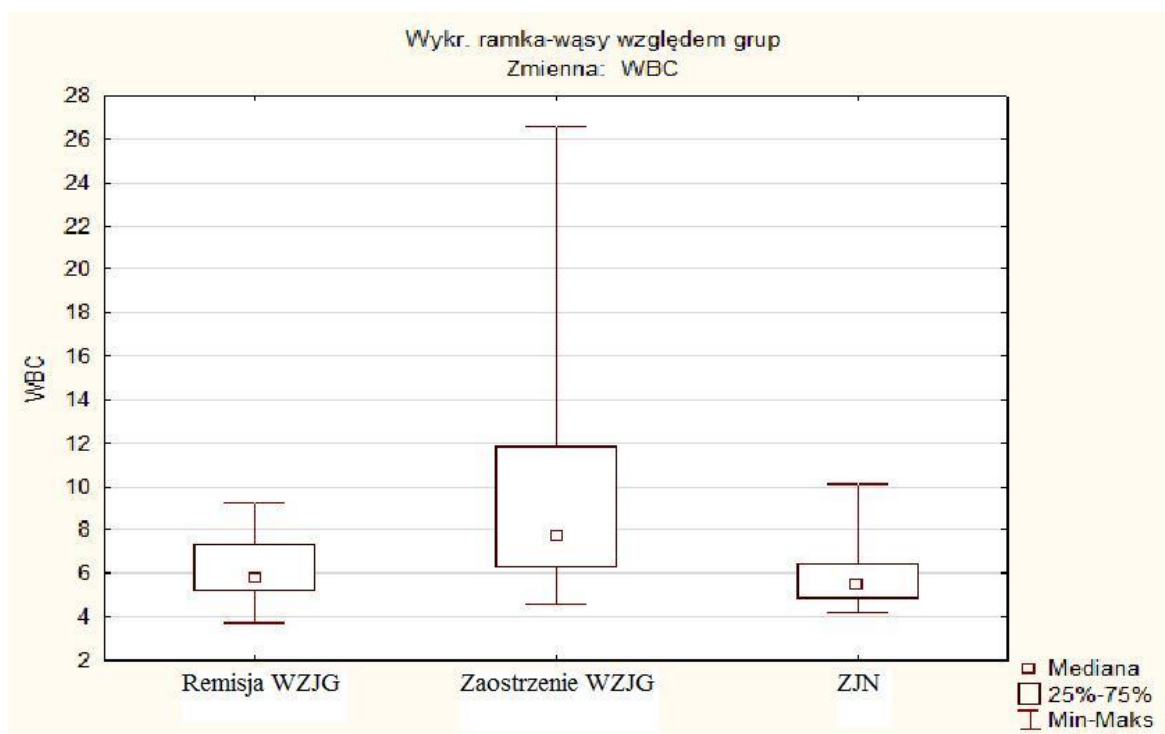
Rycina 11. Liczba erytrocytów ($\times 10^6/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Na podstawie przedstawionych wyników badań analitycznych można stwierdzić, że pod względem parametrów biochemicznych badani chorzy z ChL-C stanowili stosunkowo jednorodną grupę i nie było wyraźnych różnic pomiędzy pacjentami prezentującymi objawy kwalifikujące ich do rozpoznania zaostrzenia choroby a chorymi pozostającymi w fazie remisji. Istniały natomiast duże różnice między pacjentami z ChL-C a grupą kontrolną. Może to być efektem kilku przyczyn. Przede wszystkim, większość chorych z rozpoznaniem zaostrzeniem ChL-C (18 osób, 78%) prezentowała dolegliwości kwalifikujące ich do rozpoznania lekkiego stopnia zaostrzenia, gdzie zwykle nie dochodzi do znacznych zaburzeń w badaniach biochemicznych [117]. Ponadto, ponieważ za podstawę oceny stopnia ciężkości ChL-C przyjęto CDAI, homogenność tej grupy pacjentów mogła być skutkiem dużego znaczenia subiektywnych dolegliwości i postrzegania własnego stanu zdrowia przez chorych w tej metodzie oceny nasilenia ChL-C (Tab.1). Możliwe jest, że pacjenci z bardzo podobnym faktycznym stopniem aktywności stanu zapalnego, poprzez inny i indywidualny próg odczuwania bólu oraz nastawienie psychiczne do swojej choroby, kwalifikują się do różnej oceny aktywności ChL-C za pomocą CDAI. Należy również pamiętać, że remisję ChL-C rozpoznajemy poniżej 150 punktów CDAI, co oznacza, że nawet chorzy w remisji choroby mogą odczuwać dolegliwości spowodowane przez aktywny proces zapalny, niewystarczające do rozpoznania zaostrzenia, jednak mogące wpłynąć na wyniki badań analitycznych.

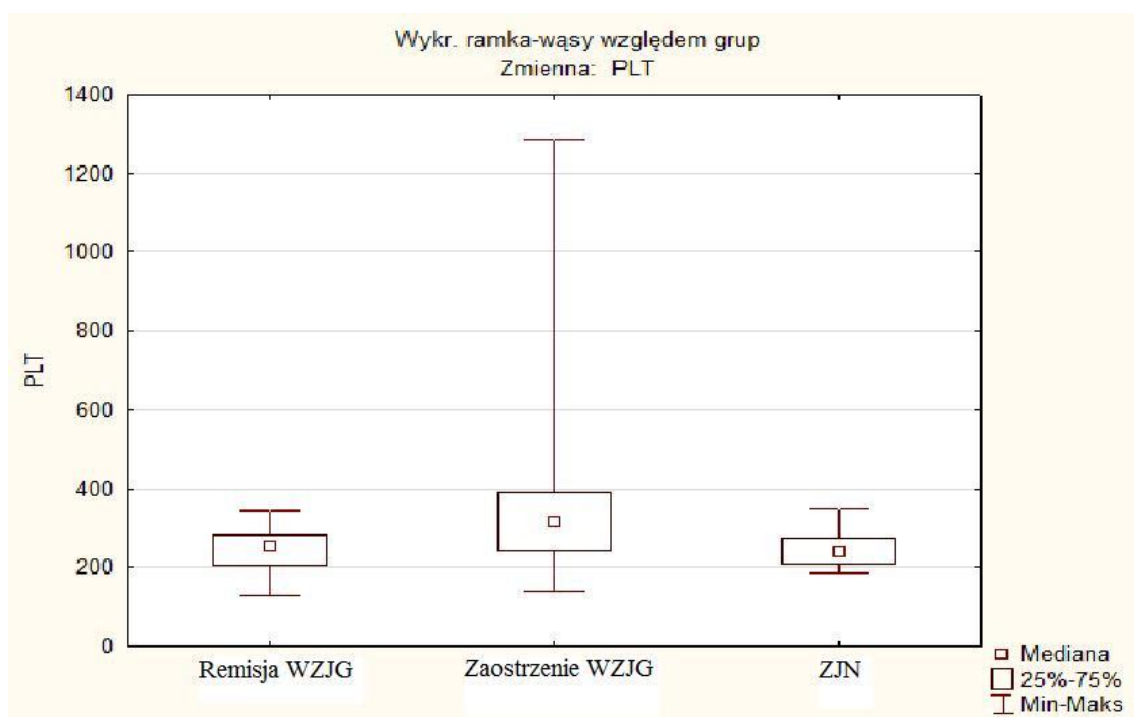
4.2.2. Wyniki badań analitycznych w grupie chorych na WZJG

W grupie chorych na WZJG obserwowano istotne różnice w wynikach badań analitycznych pomiędzy chorymi w aktywnej fazie choroby a pacjentami pozostającymi w remisji WZJG oraz grupą kontrolną. Chorzy z rozpoznaniem zaostrzeniem WZJG mieli znacząco wyższą liczbę leukocytów we krwi $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ w fazie aktywnej w

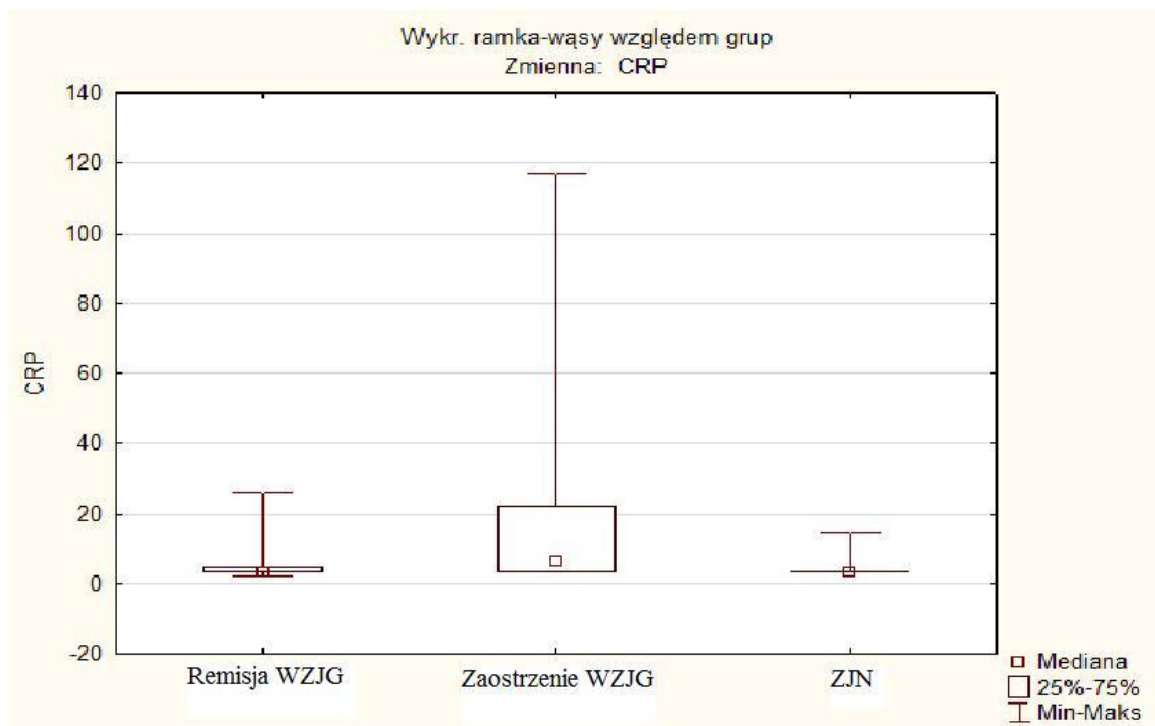
porównaniu $6,1 \times 10^3 / \mu\text{l}$ w remisji i $5,9 \times 10^3 / \mu\text{l}$ w grupie kontrolnej ($p=0,0008$ vs remisja, $p=0,001$ vs grupa kontrolna) (Ryc.12). Płytek krwi było $370 \times 10^3 / \mu\text{l}$ w fazie aktywnej i $248 \times 10^3 / \mu\text{l}$ w remisji oraz $246 \times 10^3 / \mu\text{l}$ w grupie kontrolnej ($p=0,014$ vs remisja, $p=0,002$ vs grupa kontrolna) (Ryc. 13) Stężenie CRP w surowicy wynosiło 20 mg/l w fazie aktywnej, 5,9 mg/l w remisji i 4,1 mg/l w grupie kontrolnej ($p=0,026$ vs remisja, $p=0,001$ vs grupa kontrolna) (Ryc.14). Natomiast chorzy z zaostrzeniem WZJG prezentowali istotnie niższe stężenie hemoglobiny, 12,7 g/dl w fazie aktywnej w porównaniu do 14,1 g/dl w remisji i 14 g/dl w grupie kontrolnej ($p=0,017$ vs remisja, $p=0,009$ vs grupa kontrolna) (Ryc.15). Hematokryt wynosił 39,1% w fazie aktywnej i 42,2% w remisji oraz 41,8% w grupie kontrolnej ($p=0,019$ vs remisja, $p=0,036$ vs grupa kontrolna) (Ryc.16). Stężenie albumin wynosiło 40 g/l w fazie aktywnej i 45,3 g/l w remisji oraz 46 g/l w grupie kontrolnej ($p=0,001$ vs remisja, $p=0,001$ vs grupa kontrolna) (Ryc.17). Stężenie żelaza w surowicy wynosiło 11,5 $\mu\text{mol/l}$ w fazie aktywnej i 18,2 $\mu\text{mol/l}$ w remisji oraz 19,2 $\mu\text{mol/l}$ w grupie kontrolnej ($p=0,009$ vs remisja, $p=0,001$ vs grupa kontrolna) (Ryc.18). Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie liczby erytrocytów we krwi oraz stężeniu białka całkowitego w surowicy pomiędzy badanymi grupami (Tab.9, Ryc.19,20).



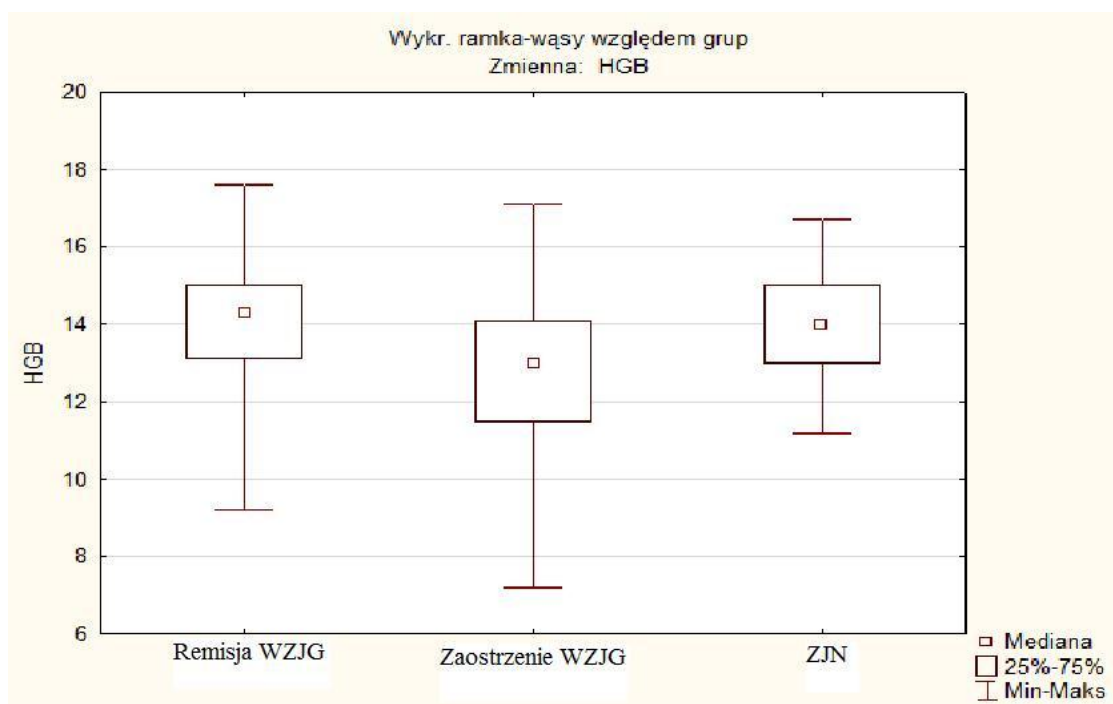
Rycina 12. Liczba leukocytów we krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



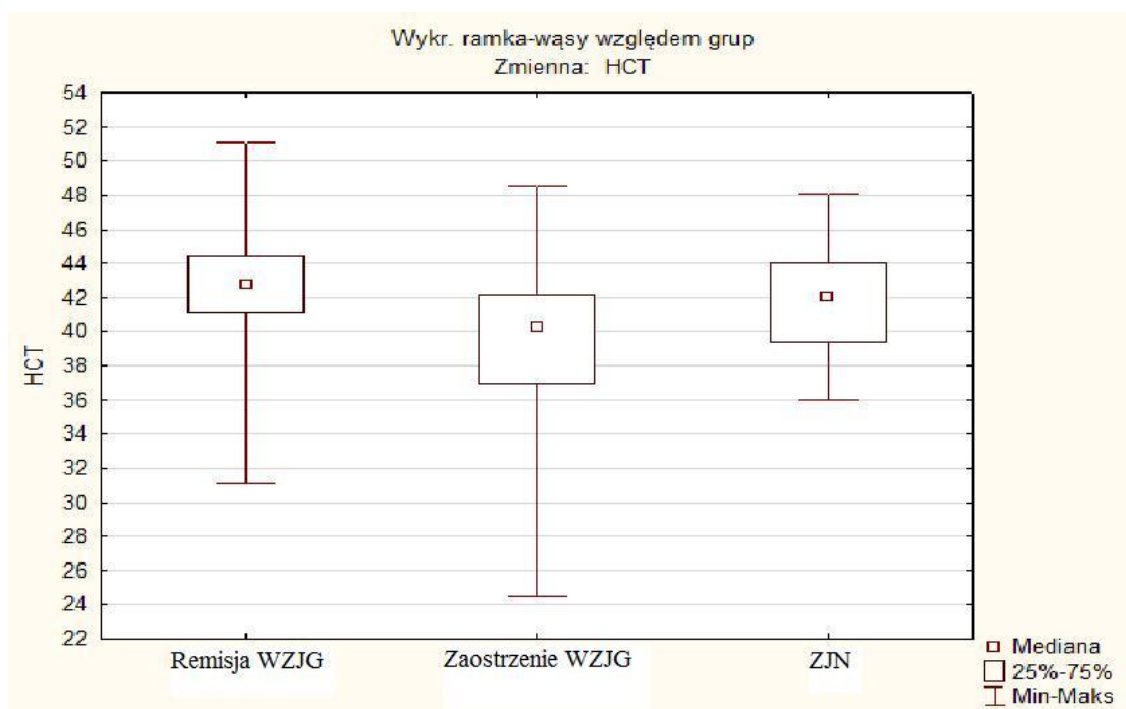
Rycina 13. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



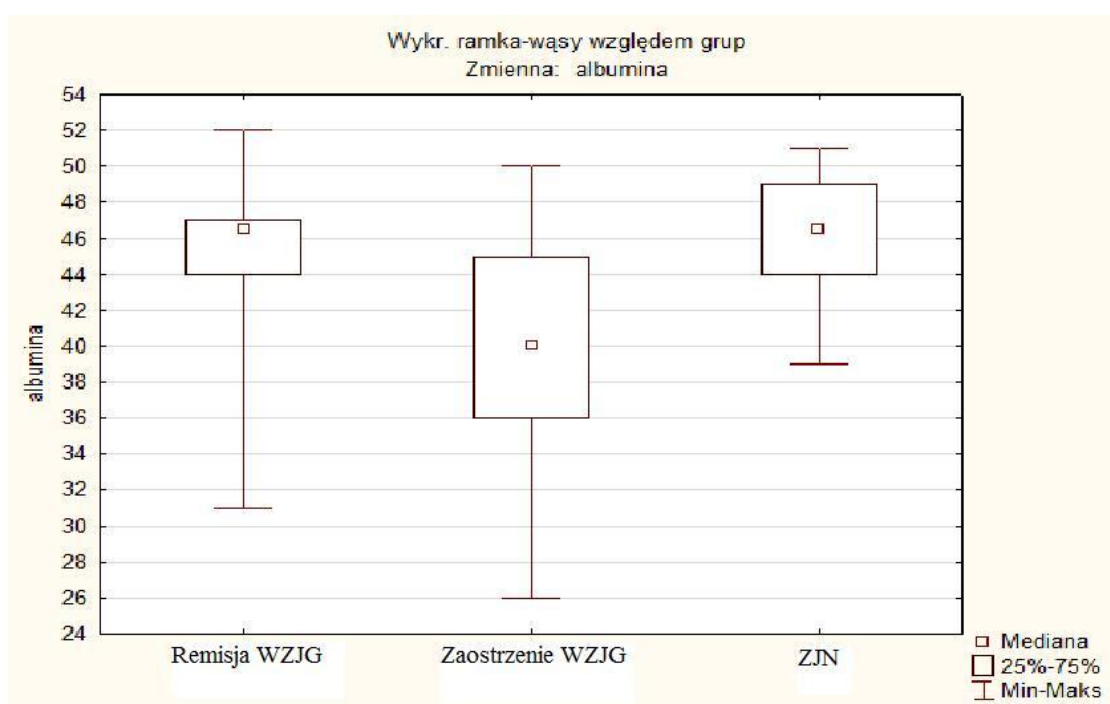
Rycina 14. Stężenie CRP w surowicy (mg/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



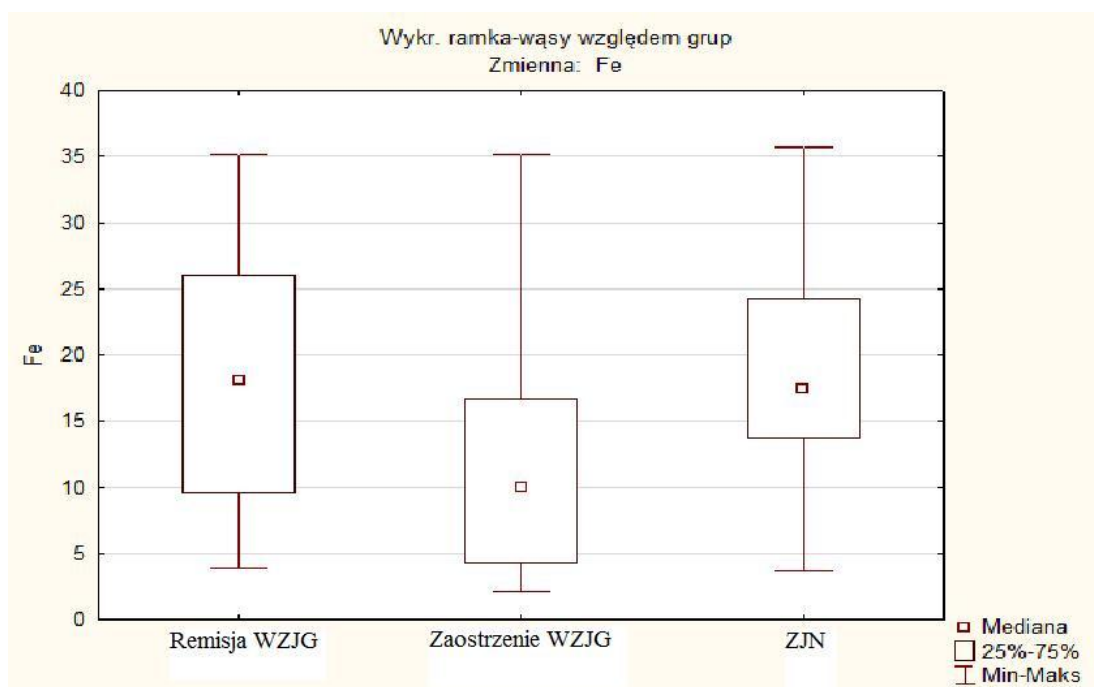
Rycina 15. Stężenie hemoglobiny (g/dl) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



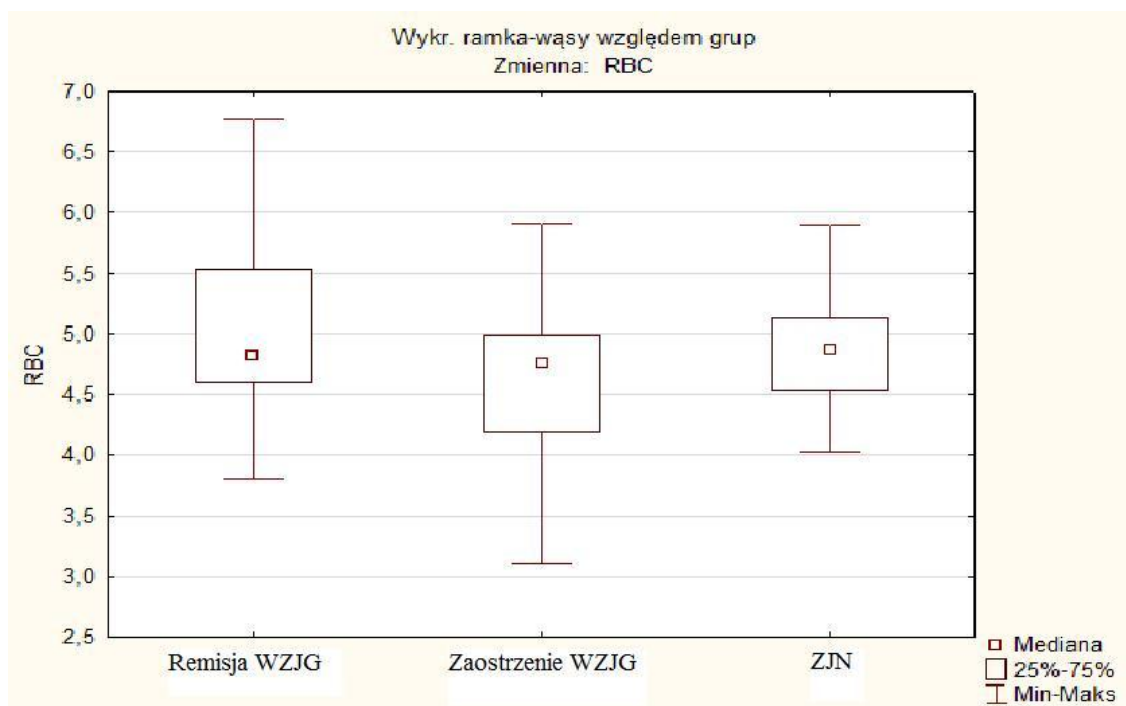
Rycina 16. Hematokryt (%) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



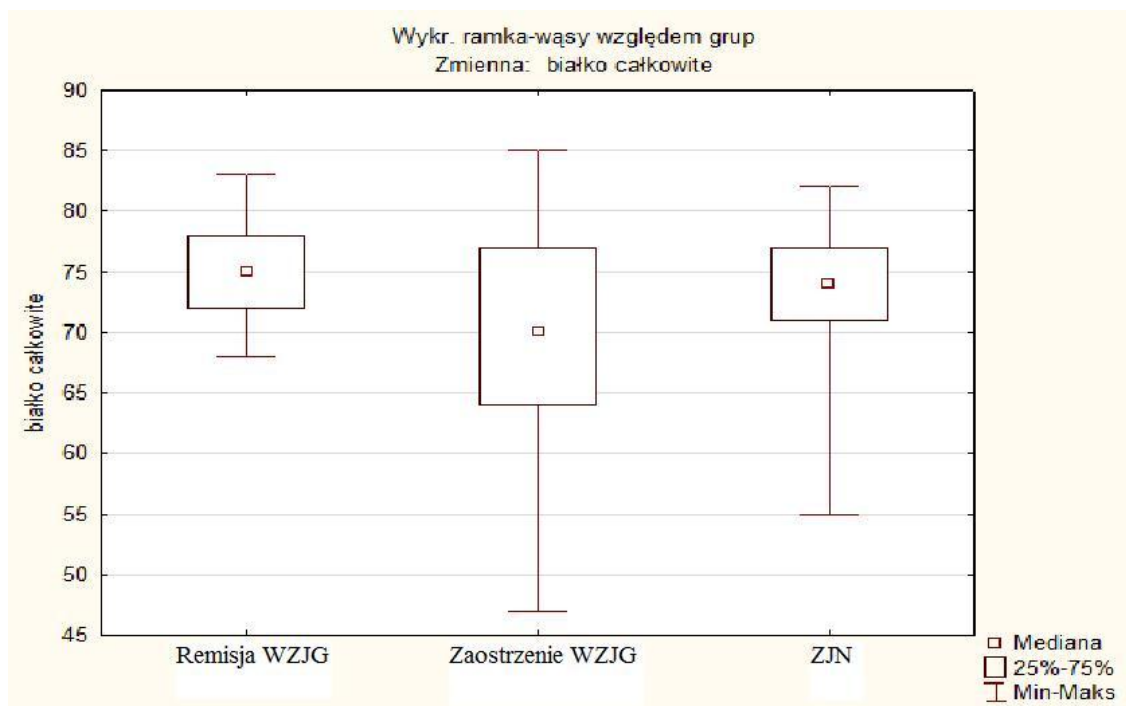
Rycina 17. Stężenie albumin w surowicy (g/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



Rycina 18. Stężenie żelaza w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



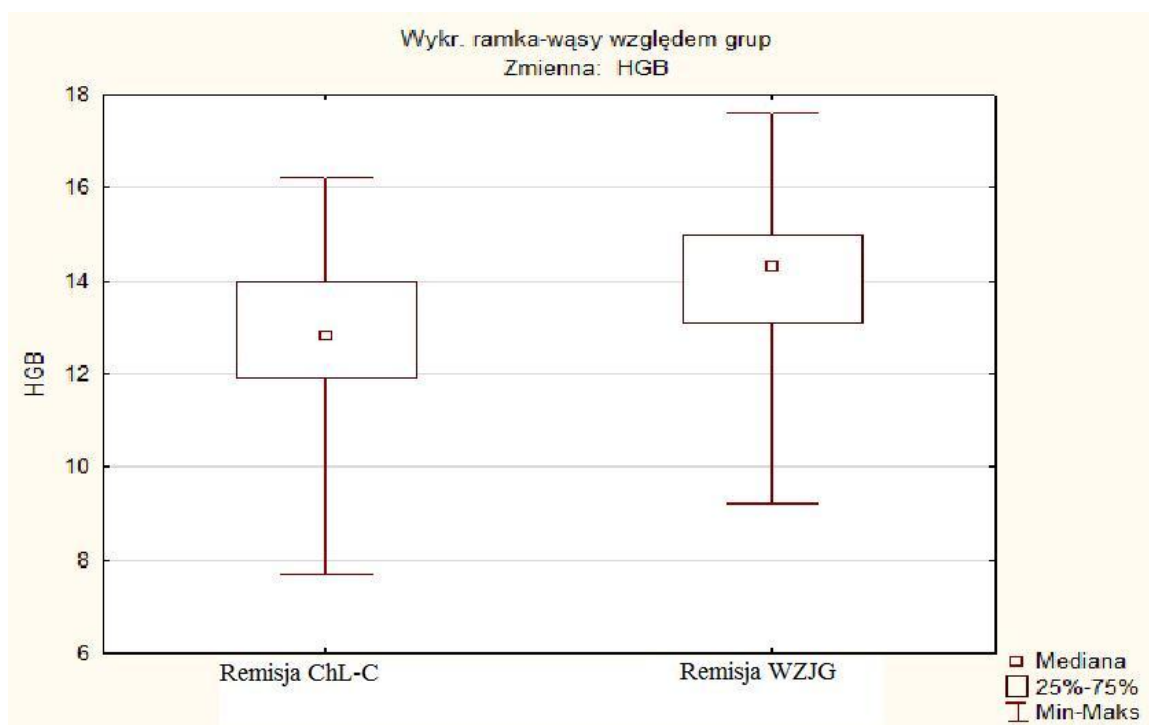
Rycina 19. Liczba erytrocytów we krwi ($\times 10^6/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej



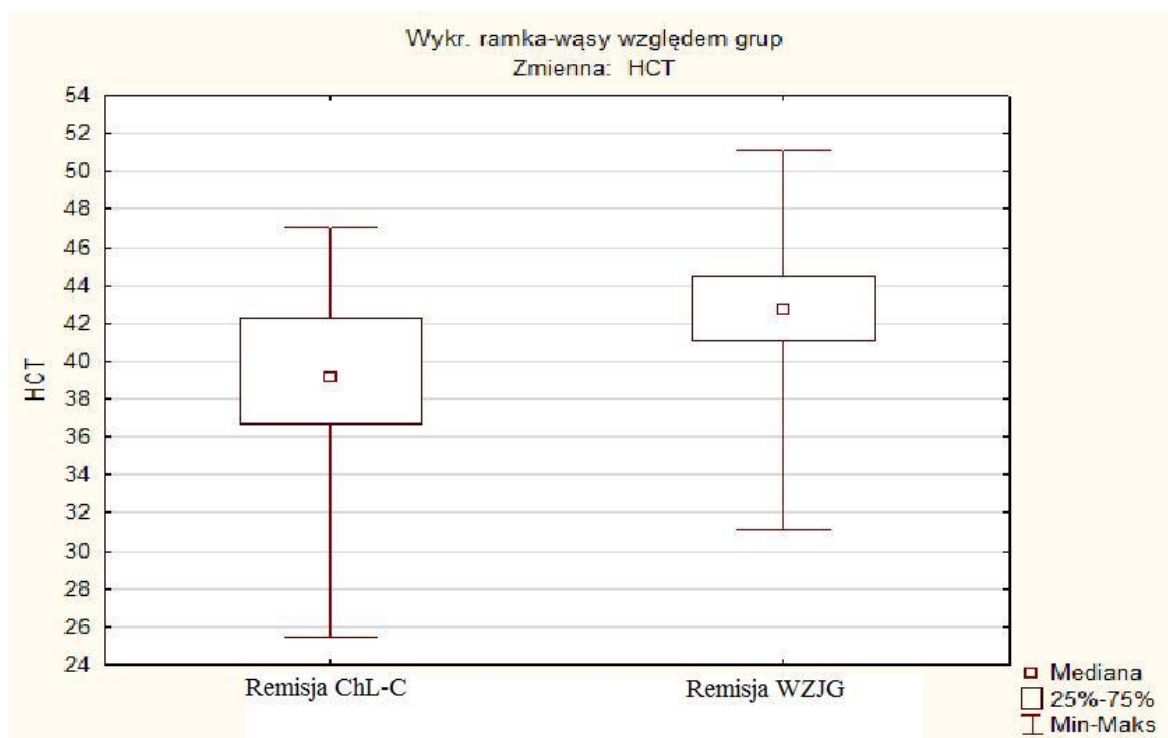
Rycina 20. Stężenie białka całkowitego w surowicy (g/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wynikach badań analitycznych w grupie chorych pozostających w remisji WZJG względem grupy kontrolnej. Sugeruje to, że w przypadku pacjentów z WZJG, charakterystyka procesu zapalnego oraz stosowane do oceny stopnia aktywności choroby kryteria pozwalają na lepsze niż w ChL-C oddzielenie chorych w nieaktywnej (również pod względem biochemicznym, nie tylko klinicznym) fazie choroby. Wydaje się to również potwierdzać porównanie wyników badań analitycznych pomiędzy grupami chorych w fazie zaostrzenia ChL-C i WZJG oraz między grupami pacjentów w okresie remisji tych chorób. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wynikami badań chorych z zaostrzeniem ChL-C i WZJG, natomiast pacjenci w okresie remisji ChL-C mieli wyraźnie niższe stężenie hemoglobiny we krwi (12,8 g/dl vs 14,1 g/dl, $p=0,01$, Ryc.21), hematokryt (39% vs 42,2%, $p=0,009$, Ryc.22), niższe stężenie albuminy (42,2 g/l vs 45,3 g/l, $p=0,014$, Ryc.23) i żelaza (11,7 $\mu\text{mol/l}$ vs 18,2 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,007$, Ryc.24) oraz wyższą liczbę

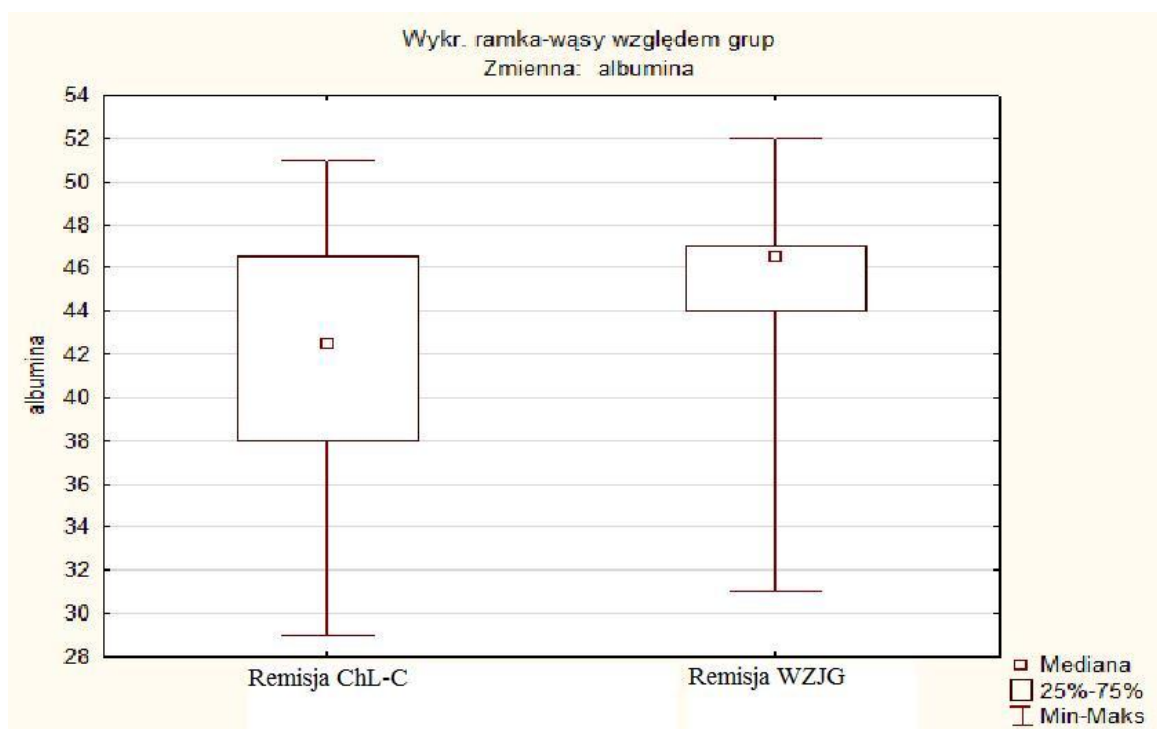
platek krwi ($304 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs $248 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p=0,034$, Ryc.25) niż chorzy w nieaktywnej fazie WZJG (Tab.9).



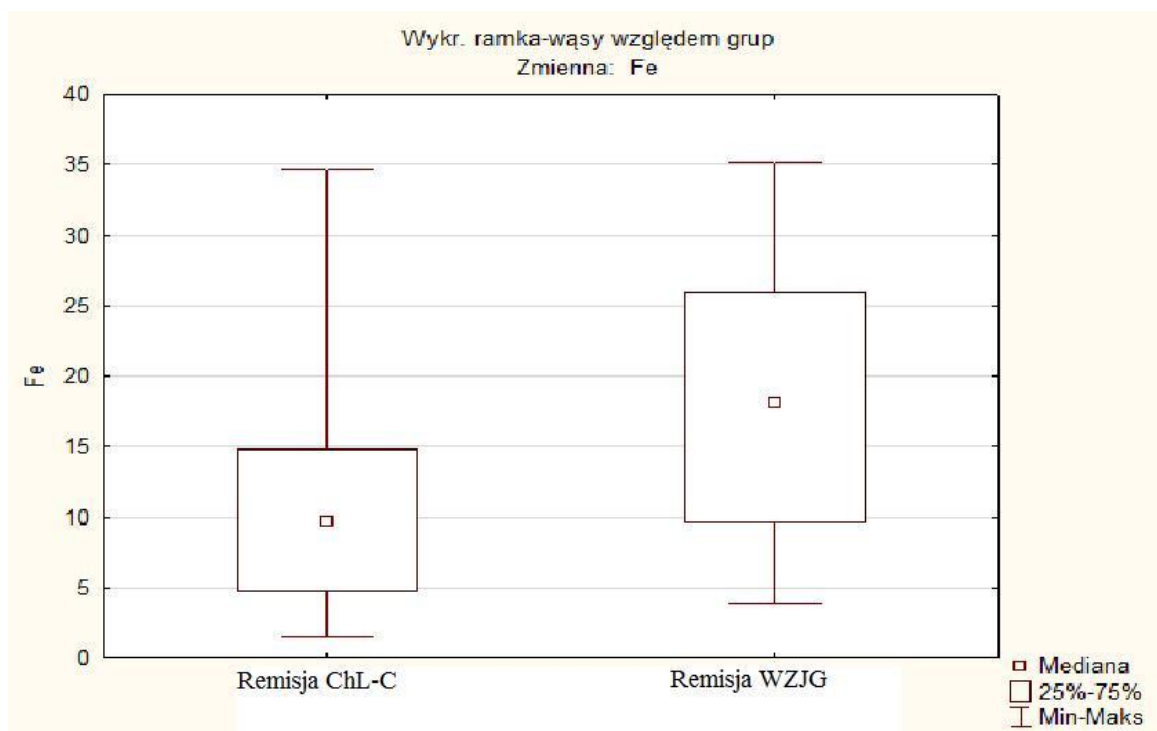
Rycina 21. Stężenie hemoglobiny we krwi (g/dl) u chorych w remisji ChL-C i WZJG



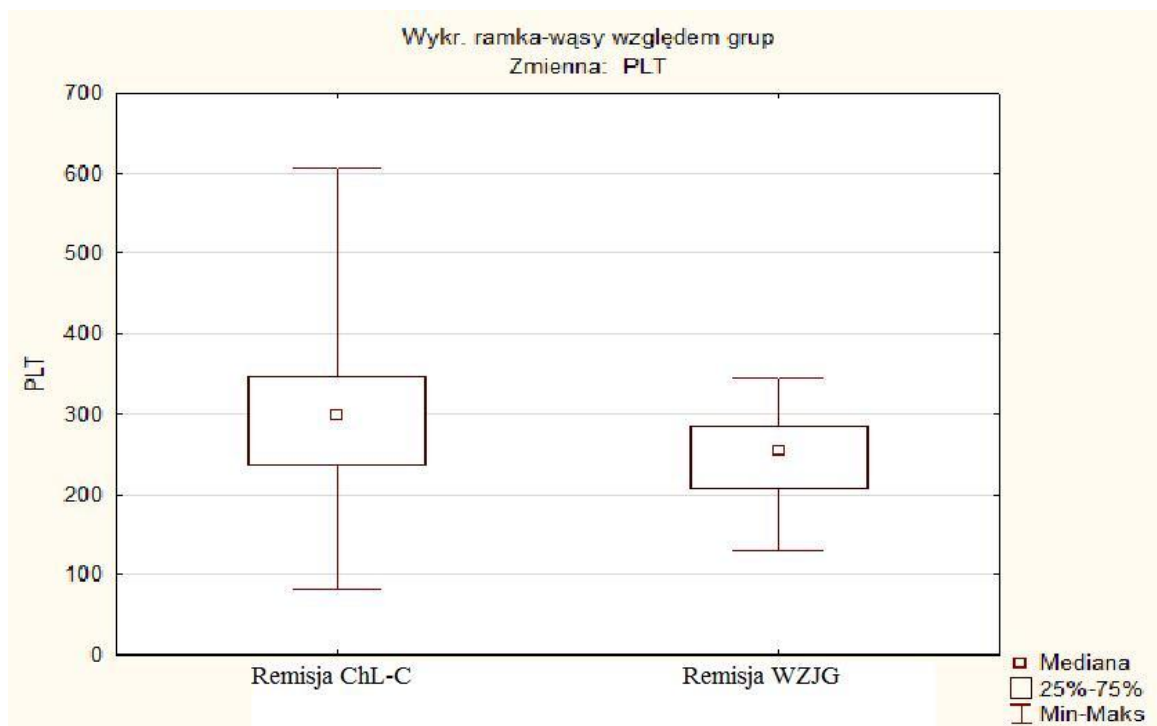
Rycina 22. Hematokryt we krwi (%) u chorych w remisji ChL-C i WZJG



Rycina 23. Stężenie albuminy w surowicy (g/l) u chorych w remisji ChL-C i WZJG



Rycina 24. Stężenie żelaza w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) u chorych w remisji ChL-C i WZJG



Rycina 25. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

4.3. Wyniki oznaczenia rozpuszczalnego HLA-G w surowicy

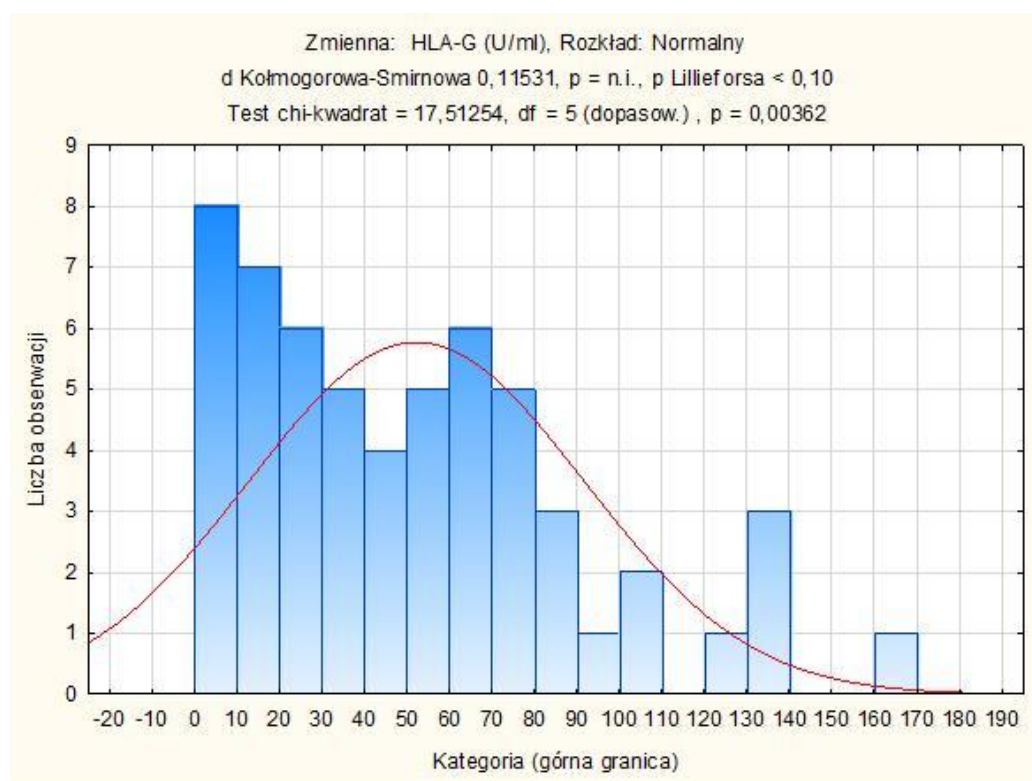
4.3.1. sHLA-G w surowicy krwi badanych grup chorych

Wyniki oznaczenia sHLA-G w surowicy badanych chorych przedstawiono w Tabeli 10.

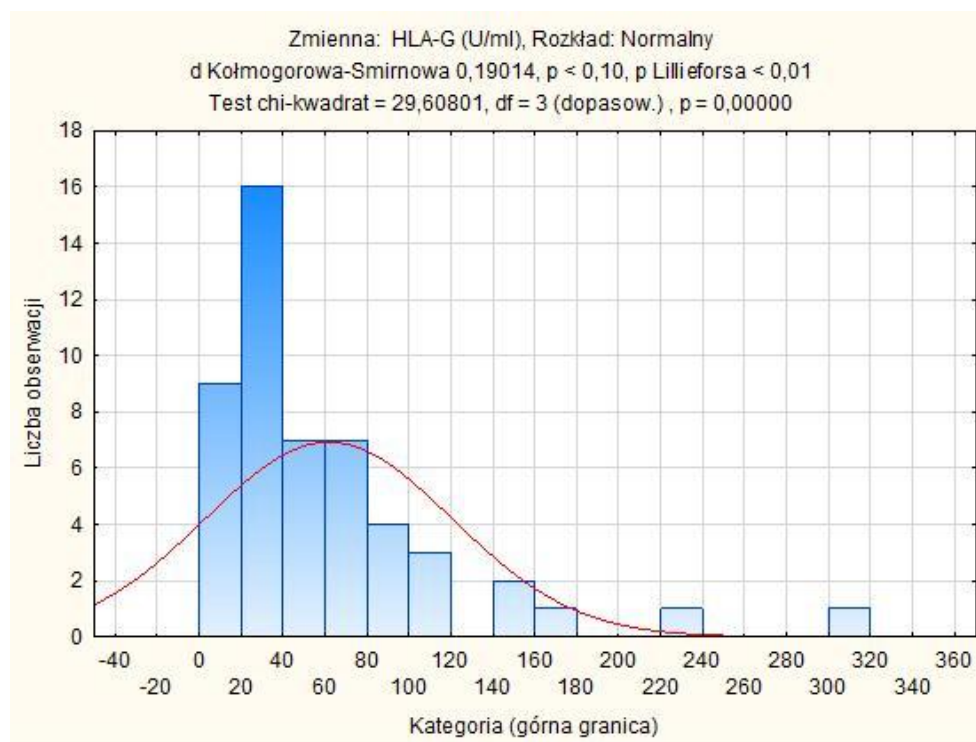
Tabela 10. Wyniki oznaczenia sHLA-G w grupach chorych

Grupa	sHLA-G (średnia $\pm$ SD) (U/ml)	sHLA-G (mediana) (U/ml)
ChL-C	52,24 $\pm$ 39,4	47,88
WZJG	61,83 $\pm$ 58,77	45,16
ZJN	55,26 $\pm$ 51,25	39,54
Wszyscy badani	56,34 $\pm$ 49,8	44,43

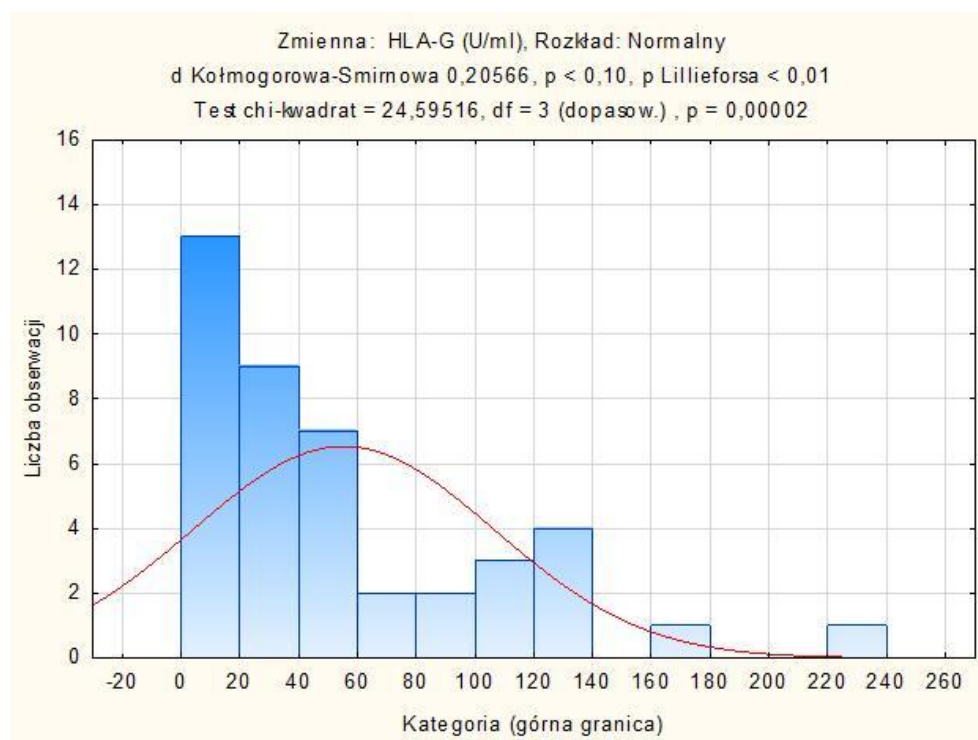
Rozkład wartości oznaczeń sHLA-G w surowicy w badanych grupach chorych przedstawiają Ryciny od 25 do 27.



Rycina 25. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie chorych na ChL-C



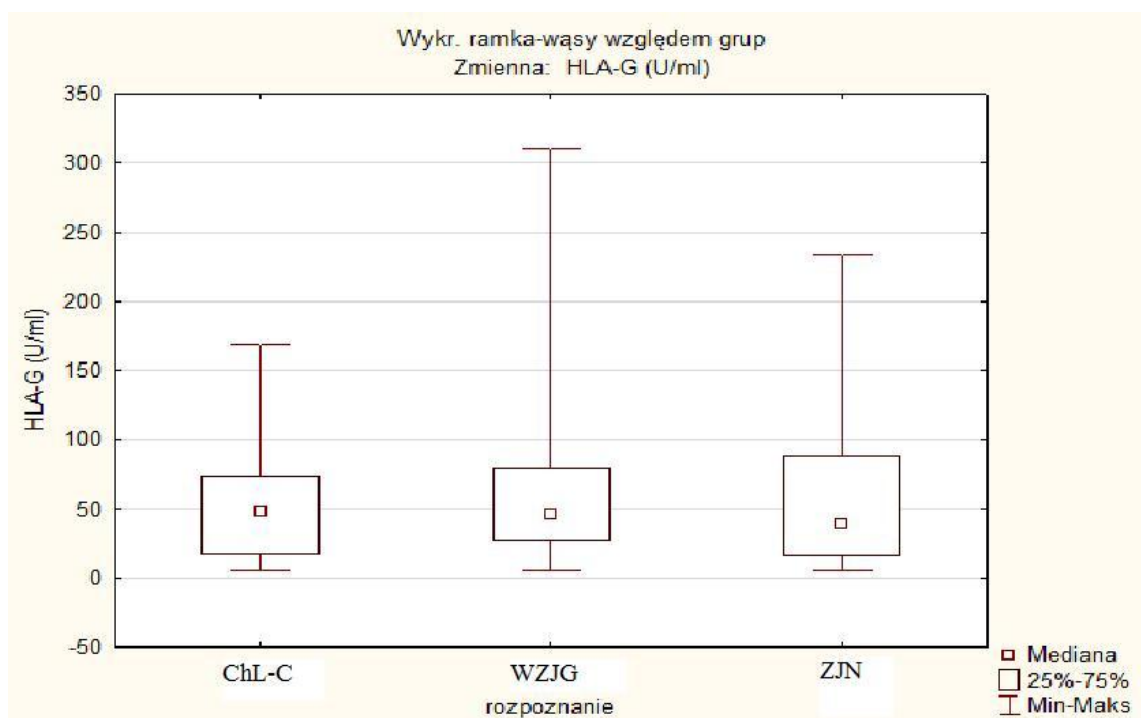
Rycina 26. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie chorych na WZJG



Rycina 27. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie kontrolnej

We wszystkich badanych grupach rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy krwi był niezgodny z rozkładem normalnym, dlatego do określania znamienności statystycznej zastosowano testy nieparametryczne takie jak Anova Kruskala-Wallisa, test U Manna-Whitneya oraz współczynnik korelacji Spearmana.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu sHLA-G w surowicy pomiędzy chorymi na ChL-C i WZJG ($p=0,65$). Również porównanie stężeń sHLA-G w grupie pacjentów z ChL-C i WZJG a grupą kontrolną nie pozwoliło na wykazanie znamiennych statystycznie różnic, wartości p wynosiły odpowiednio $p=0,77$ i $p=0,46$ (Ryc.28).



Rycina 28. Porównanie rozkładu stężenia sHLA-G w surowicy chorych na ChL-C i WZJG

4.3.2. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem płci badanych chorych

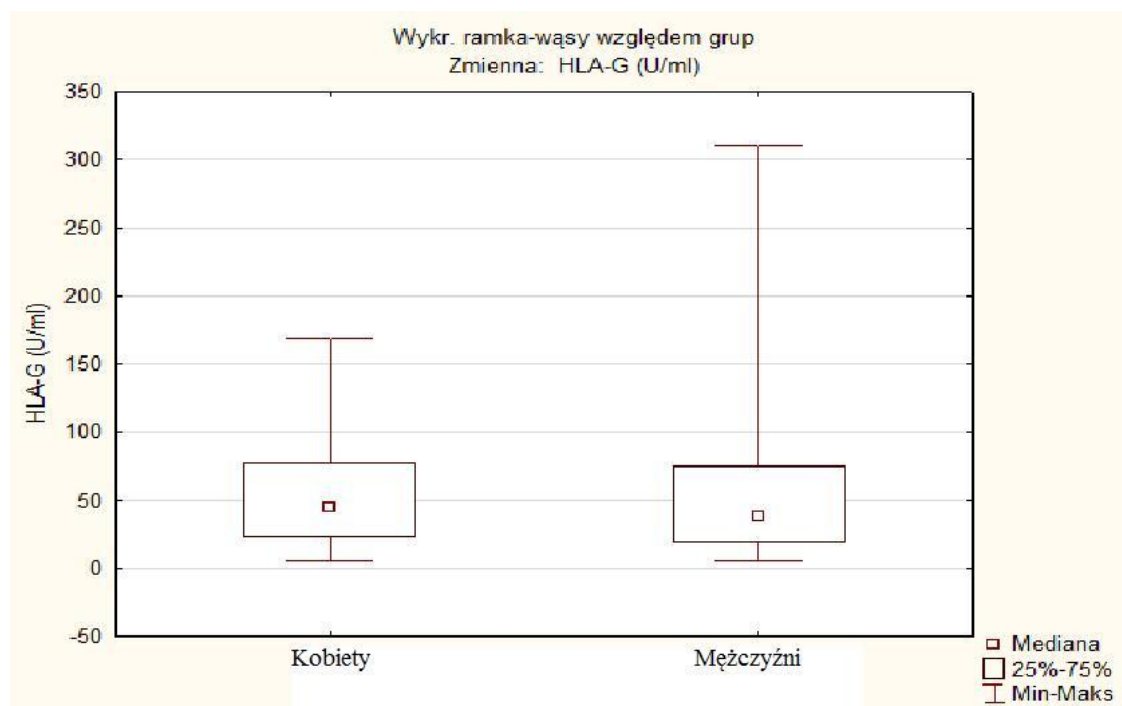
Przeprowadzono analizę rozkładu stężeń sHLA-G w surowicy w badanych grupach uwzględniając płeć chorych (Tab.11).

Tabela 11. Stężenie sHLA-G w surowicy w badanych grupach z uwzględnieniem płci chorych

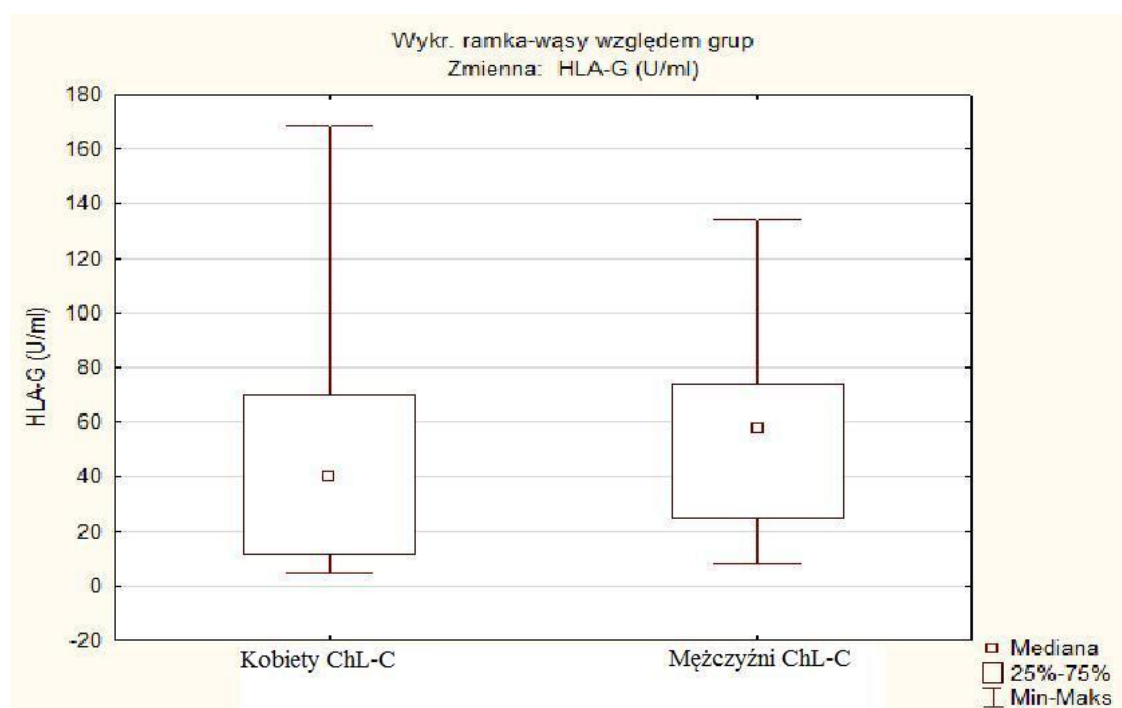
Grupa	Kobiety (U/ml) (średnia±SD)	Kobiety (U/ml) (mediana)	Mężczyźni (U/ml) (średnia±SD)	Mężczyźni (U/ml) (mediana)	p
Wszyscy badani	54,55±42,1	45	58,35±57,4	38,2	0,93
ChL-C	47,83±44	39,9	56,8±34,2	57,8	0,15
WZJG	65,28±41	55,6	59,6±68,4	35,3	0,15
ZJN	53,9±41	44,4	58,7±73	24,9	0,34

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya

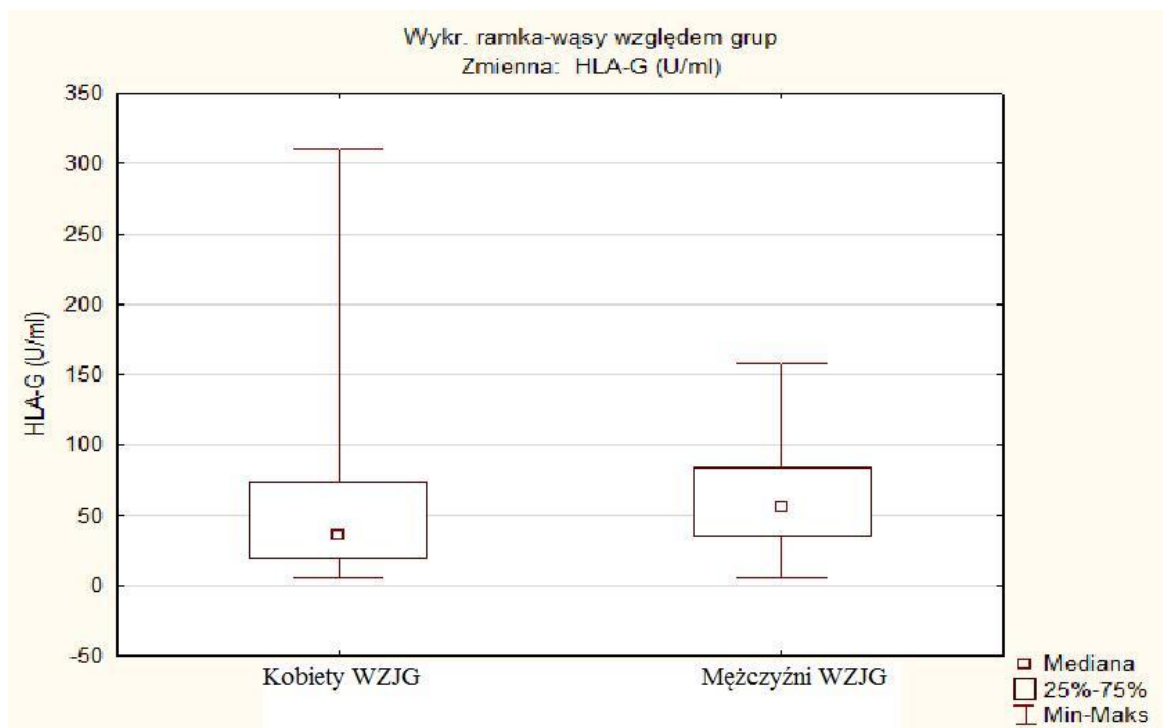
Pomimo obserwowanych niewielkich różnic w wartościach średnich stężeń sHLA-G oraz median w powyższych grupach, nie stwierdzono znamienności statystycznej (Tab.11, Ryc.29-32).



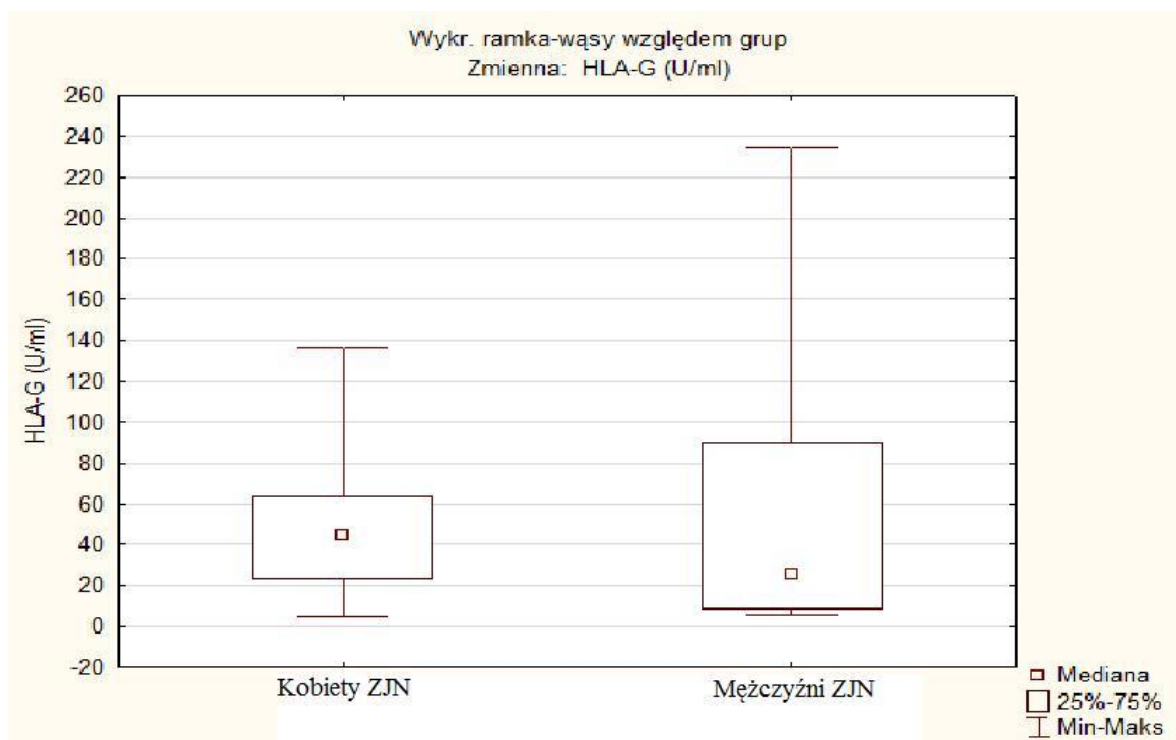
Rycina 29. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w badanej populacji



Rycina 30. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie chorych na ChL-C



Rycina 31. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie chorych na WZJG



Rycina 32. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie kontrolnej

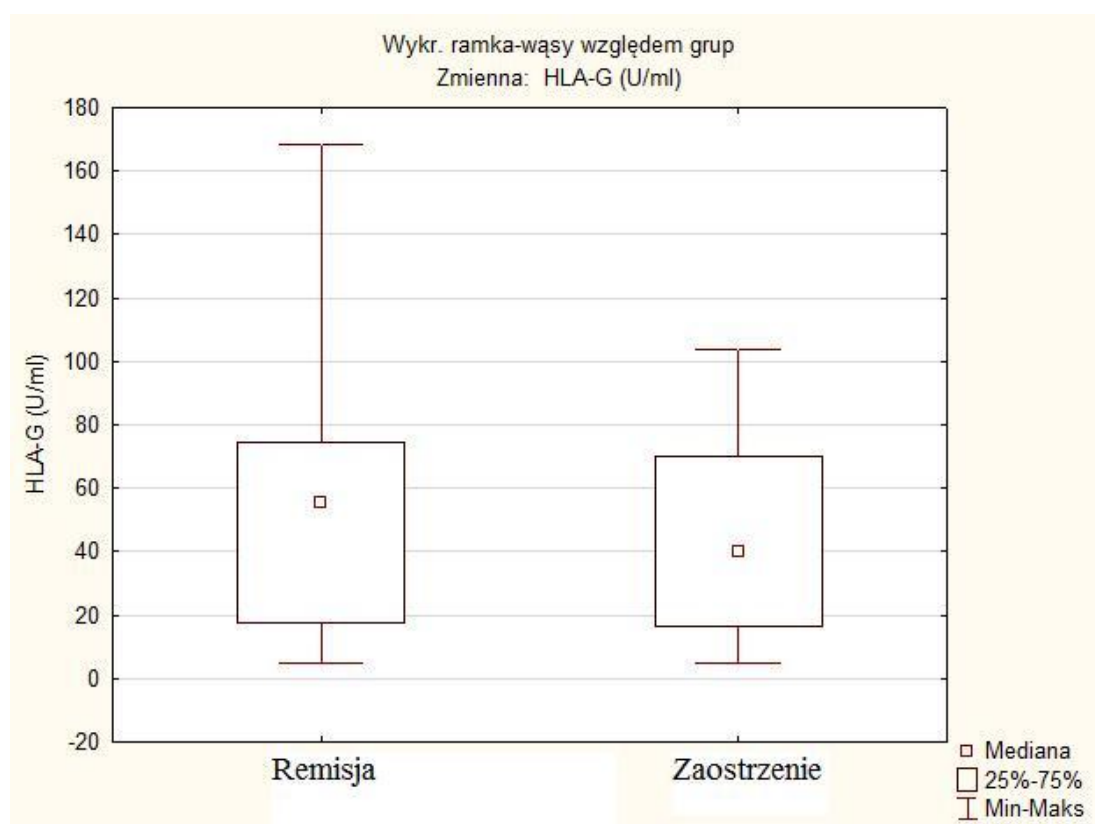
4.3.3. sHLA-G w surowicy krwi z uwzględnieniem stopnia aktywności choroby

Zaobserwowano wyraźną różnicę w medianie stężeń sHLA-G w surowicy chorych na NZJ pomiędzy grupą pacjentów pozostających w okresie remisji choroby a grupą z zaostrzeniem procesu zapalnego, zarówno w przypadku ChL-C, jak i WZJG (Tab.12). Odnotowane różnice nie miały jednak znamienności statystycznej (Ryc.33,34).

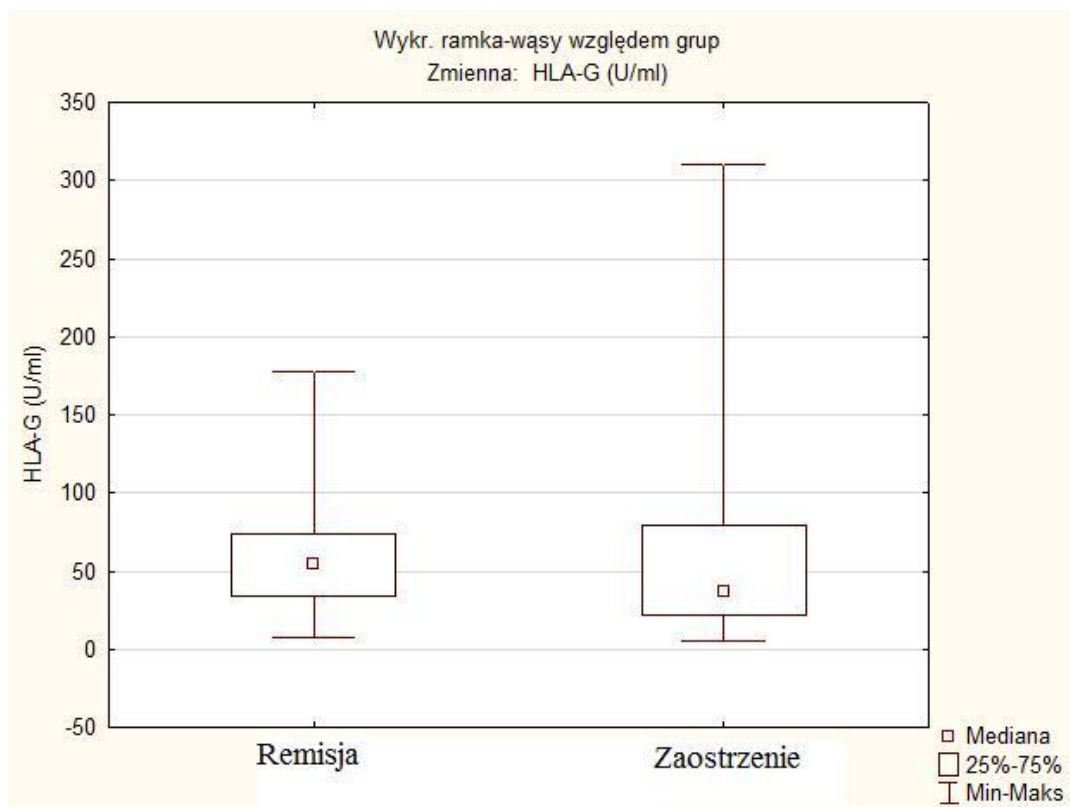
Tabela 12. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem stopnia aktywności choroby

	Remisja (U/ml) (średnia±SD)	Remisja (U/ml) (mediana)	Zaostrzenie (U/ml) (średnia±SD)	Zaostrzenie (U/ml) (mediana)	p
ChL-C	56,6±43,7	55,4	45,8±31,8	39,9	0,53
WZJG	59,7±41,4	54,2	63,9±72,4	36,9	0,44

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya



Rycina 33. Stężenie sHLA-G w surowicy względem aktywności ChL-C



Rycina 34. Stężenie sHLA-G w surowicy względem aktywności WZJG

4.3.4. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem stosowanego leczenia immunosupresyjnego

Ze względu na możliwy wpływ stosowanych leków immunosupresyjnych na stężenie sHLA-G w surowicy krwi, przeprowadzono porównanie zachowania się stężeń sHLA-G pomiędzy pacjentami leczonymi immunosupresyjnie oraz chorymi nie wymagającymi takiej terapii.

W całej grupie chorych na NZJ nie stwierdzono różnic w stężeniach sHLA-G w surowicy pomiędzy chorymi w trakcie terapii glikokortykosteroidami lub azatiopryną (47,8 U/ml) a pacjentami nie otrzymującymi takiego leczenia (49,9 U/ml, $p=0,7$) (Tab.13).

Analizując stężenia sHLA-G w surowicy pobranej od chorych na ChL-C, stwierdzono wyższe wartości tego stężenia u pacjentów leczonych immunosupresyjnie

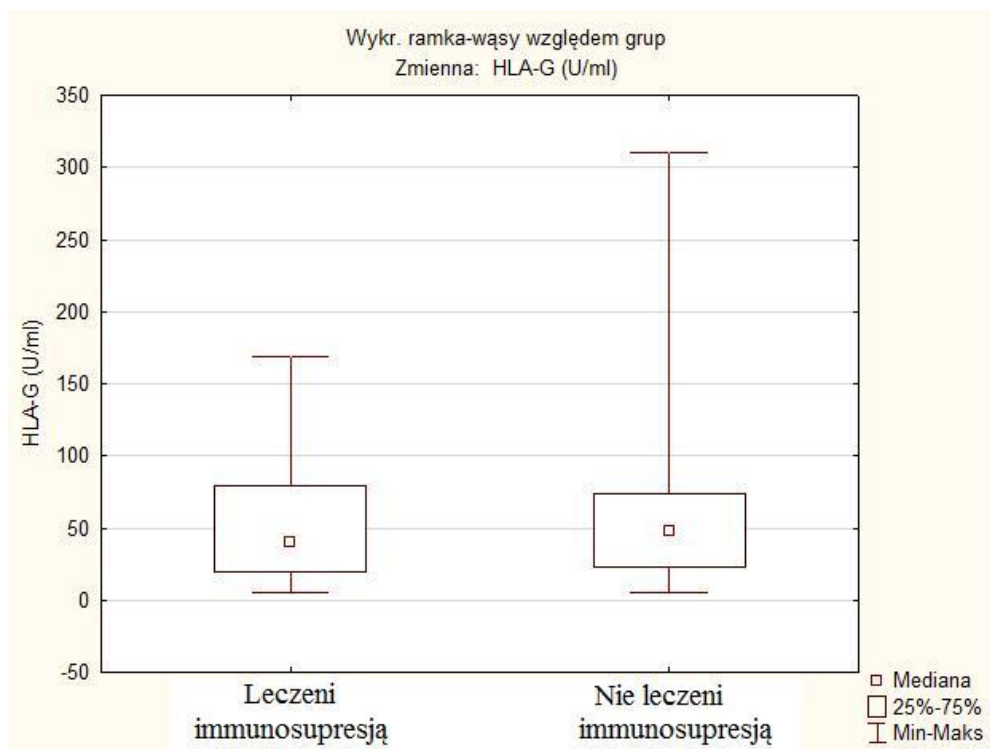
niż u chorych nie będących w trakcie takiej terapii (57,5 U/ml vs 44,7 U/ml), jednak nie stwierdzono istotności statystycznej ($p=0,43$).

Analizując wyniki sHLA-G uzyskane w grupie chorych na WZJG, odnotowano odwrotną tendencję, pacjenci otrzymujący leki immunosupresyjne mieli niższe stężenia sHLA-G w surowicy (36,9 U/ml vs 54,2 U/ml). Również w tej grupie nie zaobserwowano istotności statystycznej ($p=0,2$) (Tab.13; Ryc.35-37).

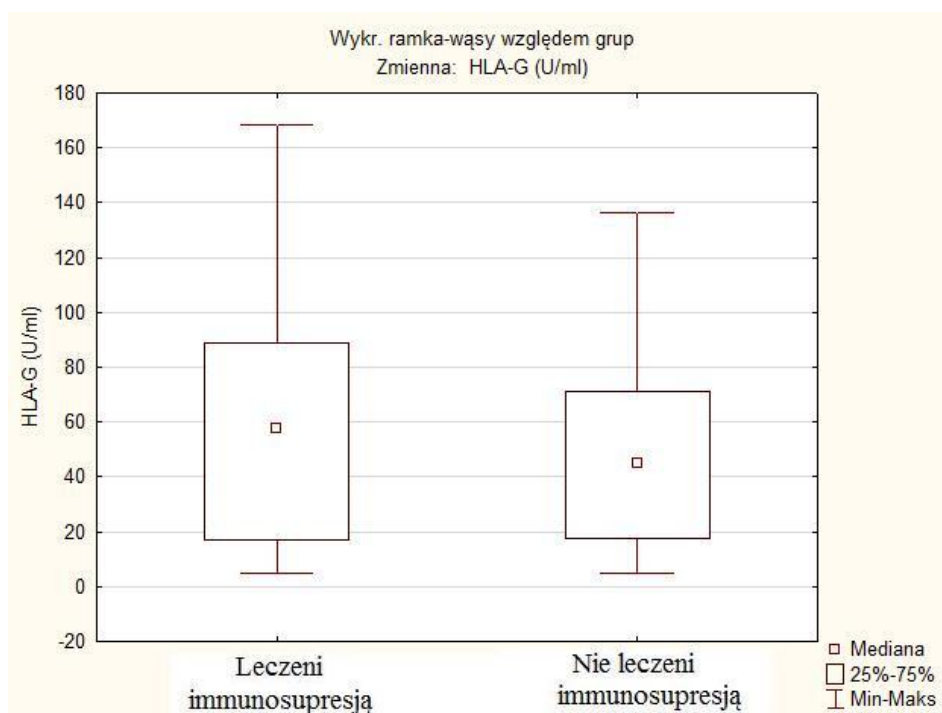
Tabela 13. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem leczenia immunosupresyjnego (glikokortykosteroidy lub azatiopryna)

	Ogółem	ChL-C	WZJG
Nie leczeni immunosupresją (U/ml; średnia$\pm$SD)	60,15 $\pm$ 55	48 $\pm$ 36,2	73,45 $\pm$ 69,6
Nie leczeni immunosupresją (U/ml; mediana)	47,9	44,7	54,2
Leczeni immunosupresją (U/ml; średnia$\pm$SD)	53,44 $\pm$ 45	58,5 $\pm$ 44	43,8 $\pm$ 29,7
Leczeni immunosupresją (U/ml; mediana)	49,9	57,5	36,9
p	0,7	0,43	0,2

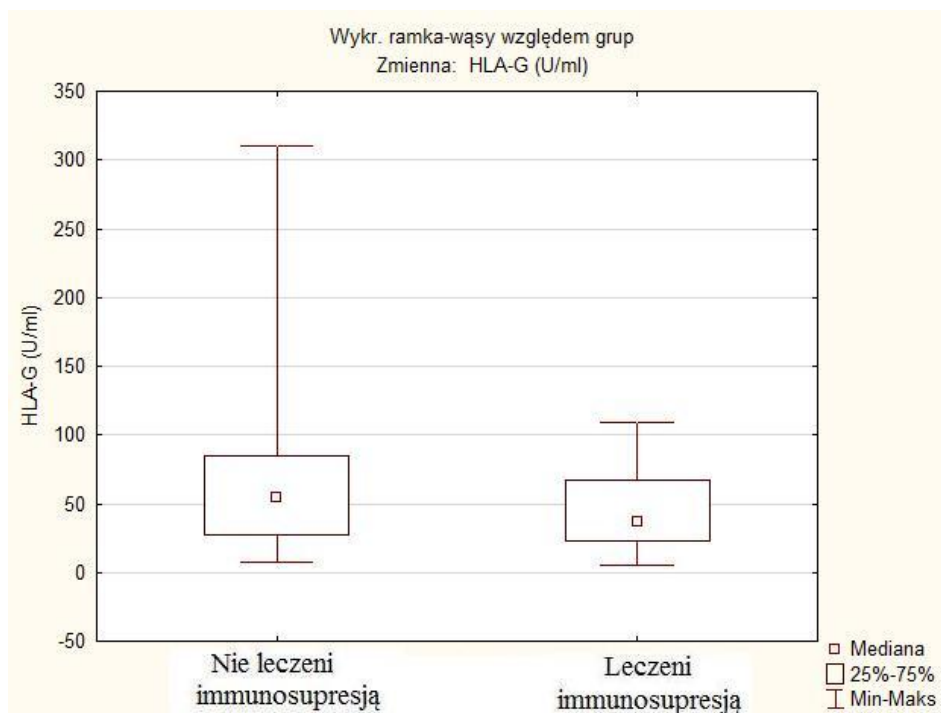
Objaśnienia: test U Manna-Whitneya



Rycina 35. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z NZJ leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie



Rycina 36. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z ChL-C leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie



Rycina 37. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z WZJG leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie

Przeprowadzono również analizę stężeń sHLA-G w surowicy tych chorych z uwzględnieniem jedynie leczenia azatiopryną (Tab.14). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic zarówno w całej grupie badanej, jak i w grupach chorych na ChL-C i WZJG. Na uzyskane wyniki mogła wpływać niewielka liczebność grup chorych otrzymujących azatioprynę, a mianowicie było tych pacjentów 9 z ChL-C oraz 5 chorych na WZJG (Tab.6).

Tabela 14. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem leczenia immunosupresyjnego azatiopryną

	Nie leczeni azatiopryną (U/ml) (średnia±SD)	Nie leczeni azatiopryną (U/ml) (mediana)	Leczeni azatiopryną (U/ml) (średnia±SD)	Leczeni azatiopryną (U/ml) (mediana)	p
Ogółem	56,2±51	46,5	59,4±37,4	52,3	0,38
ChL-C	50,6±38,5	47,9	61±45,4	47,1	0,53
WZJG	62,2±61,4	41,5	58,8±27,2	73,5	0,56

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya

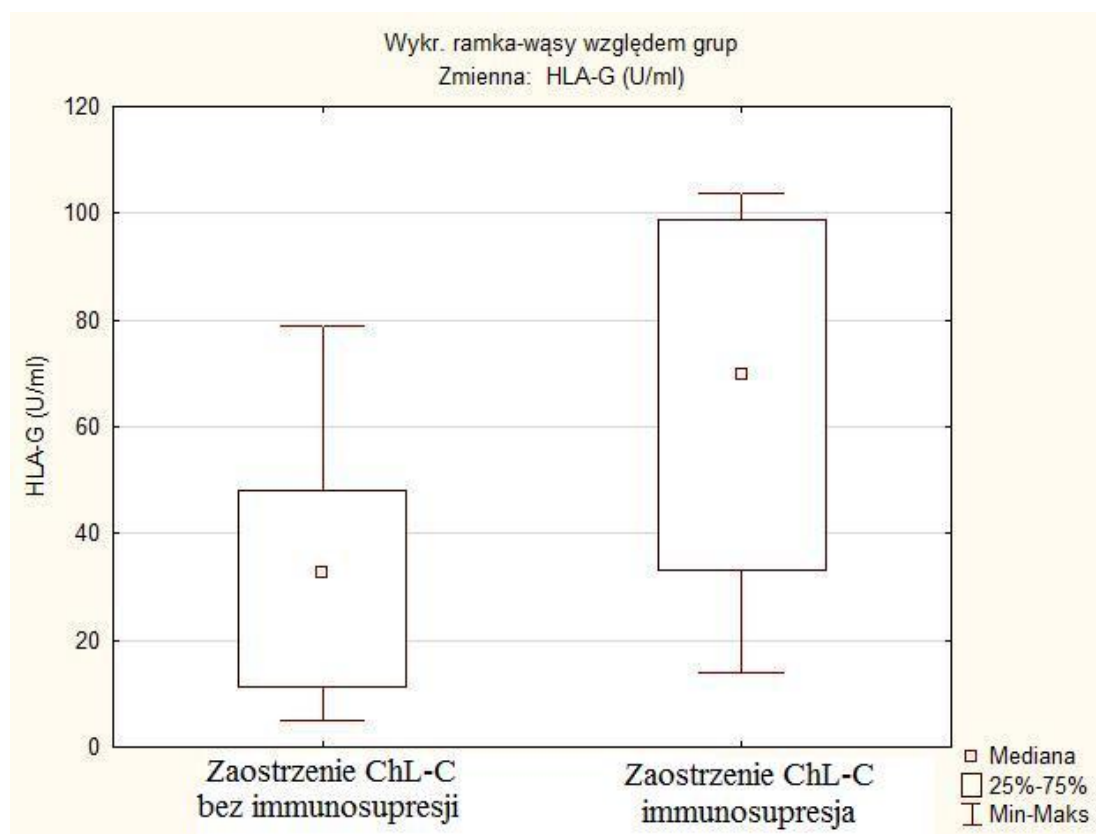
4.3.5. sHLA-G w surowicy chorych z NZJ w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Przeprowadzono szczegółową analizę zachowania się stężenia sHLA-G w surowicy chorych na ChL-C i WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby. W grupie chorych na ChL-C zaobserwowano znacząco wyższe stężenie sHLA-G w surowicy pacjentów prezentujących objawy zaostrzenia choroby, którzy otrzymywali leczenie immunosupresyjne, w porównaniu do chorych nie będących w trakcie takiej terapii (69,9 U/ml vs 32,5 U/ml, $p=0,03$) (Ryc.38). W grupie pacjentów pozostających w okresie remisji można zauważyć odwrotny trend, wśród chorych otrzymujących leczenie immunosupresyjne obserwowano tendencję do niższego stężenia sHLA-G w surowicy krwi (43,5 U/ml vs 61 U/ml, $p=0,52$) (Tab.15).

Tabela 15. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych z ChL-C w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Grupa chorych	Stężenie sHLA-G (U/ml)		p
	Immunosupresja	Bez immunosupresji	
Zaostrzenie (liczebność)	69,9 ± 36,33 (9)	32,5 ± 21,3 (14)	0,03
Remisja (liczebność)	43,5 ± 48,7 (14)	61 ± 41 (20)	0,52
p	0,3	0,08	

Objaśnienia: mediana ± odchylenie standardowe; test U Manna-Whitneya



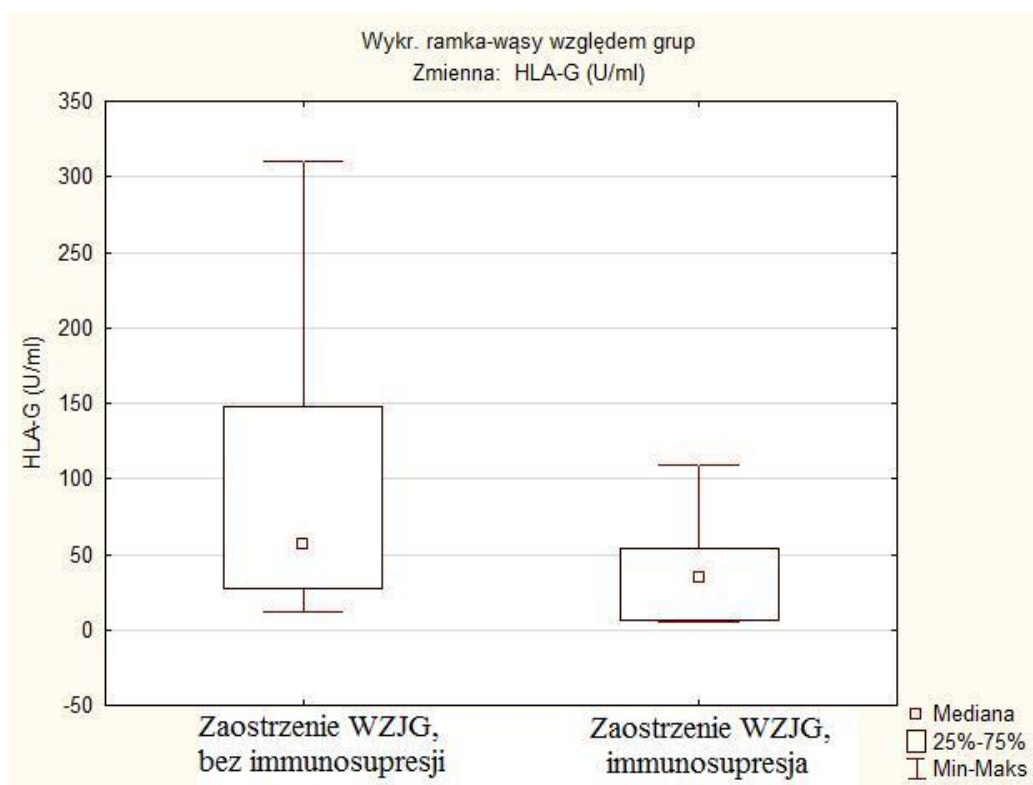
Rycina 38. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem ChL-C w zależności od stosowanego leczenia. Różnica znamionna statystycznie $p=0,03$

W grupie chorych na WZJG zaobserwowano odwrotne trendy niż w przypadku grupy pacjentów z ChL-C. Chorzy na WZJG w okresie zaostrzenia, w trakcie leczenia immunosupresyjnego, prezentowali znacząco niższe stężenia sHLA-G w surowicy w porównaniu do pacjentów nie otrzymujących immunosupresji (34,9 U/ml vs 57 U/ml, $p=0,047$) (Ryc.39). Natomiast u chorych na WZJG w fazie remisji, którzy stosowali leki immunosupresyjne, obserwowano wyższe stężenia sHLA-G względem chorych nie będących w trakcie immunosupresji (60 U/ml vs 45,9 U/ml) (Tab.16). Należy zwrócić uwagę na bardzo niewielką liczebność grupy pacjentów w okresie remisji, poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu, wynoszącą 5 osób, co może wpływać na uzyskane wyniki testów statystycznych.

Tabela 16. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych z WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Grupa chorych	Stężenie sHLA-G (U/ml)		p
	Immunosupresja	Bez immunosupresji	
Zaostrzenie (liczebność)	34,9 ± 31,1 (15)	57 ± 75,8 (11)	0,047
Remisja (liczebność)	60 ± 17,3 (5)	45,9 ± 45,9 (20)	0,45
p	0,053	0,4	

Objaśnienia: mediana ± odchylenie standardowe; test U Manna-Whitneya



Rycina 39. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem WZJG w zależności od stosowanego leczenia. Różnica znamionna statystycznie $p=0,047$

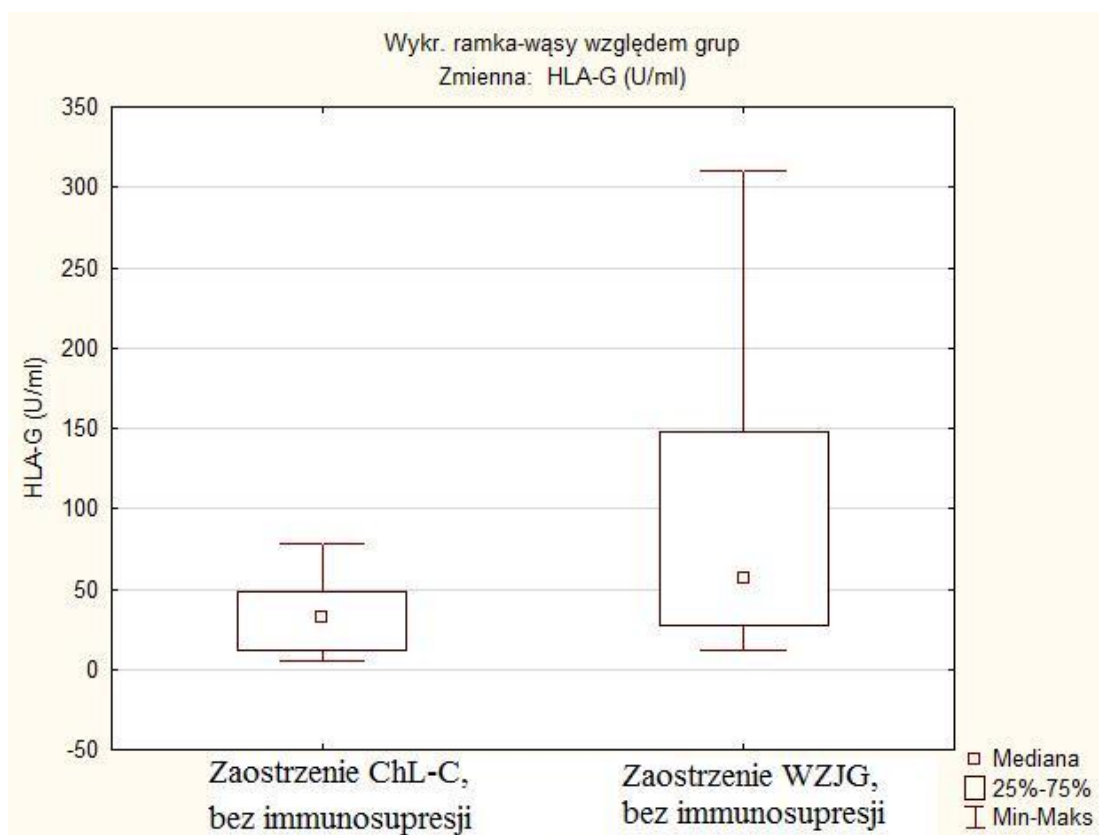
Przeprowadzono również porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi pomiędzy chorymi na ChL-C i WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby (Tab.17). Stwierdzono istotnie niższe stężenie sHLA-G w surowicy w grupie pacjentów z zaostrzeniem ChL-C, nie będących w trakcie leczenia immunosupresyjnego, w porównaniu do chorych z zaostrzeniem WZJG, również nie poddawanych takiej terapii (32,5 U/ml vs 57 U/ml, $p=0,026$) (Ryc. 40). Obserwowano również wyższe stężenia sHLA-G w surowicy u chorych z zaostrzeniem ChL-C, otrzymujących leczenie immunosupresyjne, względem pacjentów z zaostrzeniem WZJG, będących w trakcie terapii immunosupresyjnej (69,9 U/ml vs 34,9 U/ml, $p=0,12$). W grupie pacjentów w fazie remisji NZJ, nie leczonych immunosupresyjnie, stwierdzono wyższe stężenia sHLA-G w surowicy u chorych na ChL-C niż na WZJG

(61 U/ml vs 45,9 U/ml, $p=0,97$). Natomiast wśród pacjentów w okresie remisji NZJ, w trakcie terapii immunosupresyjnej, wyższe stężenia sHLA-G w surowicy obserwowano u chorych na WZJG niż ChL-C (60 U/ml vs 43,5 U/ml, $p=0,39$).

Tabela 17. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych na ChL-C i WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Grupa chorych	Stężenie sHLA-G (U/ml)			
	Remisja, immunosupresja	Remisja, bez immunosupresji	Zaostrzenie, immunosupresja	Zaostrzenie, bez immunosupresji
ChL-C	43,5 ± 48,7	61 ± 41	69,9 ± 36,33	32,5 ± 21,3
(liczebność)	(14)	(20)	(9)	(14)
WZJG	60 ± 17,3	45,9 ± 45,9	34,9 ± 31,1	57 ± 75,8
(liczebność)	(5)	(20)	(15)	(11)
p	0,39	0,97	0,12	0,026

Objaśnienia: mediana ± odchylenie standardowe; test U Manna-Whitneya



Rycina 40. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem ChL-C i WZJG, nie otrzymujących leczenia immunosupresyjnego. Różnica znamionna statystycznie $p=0,026$

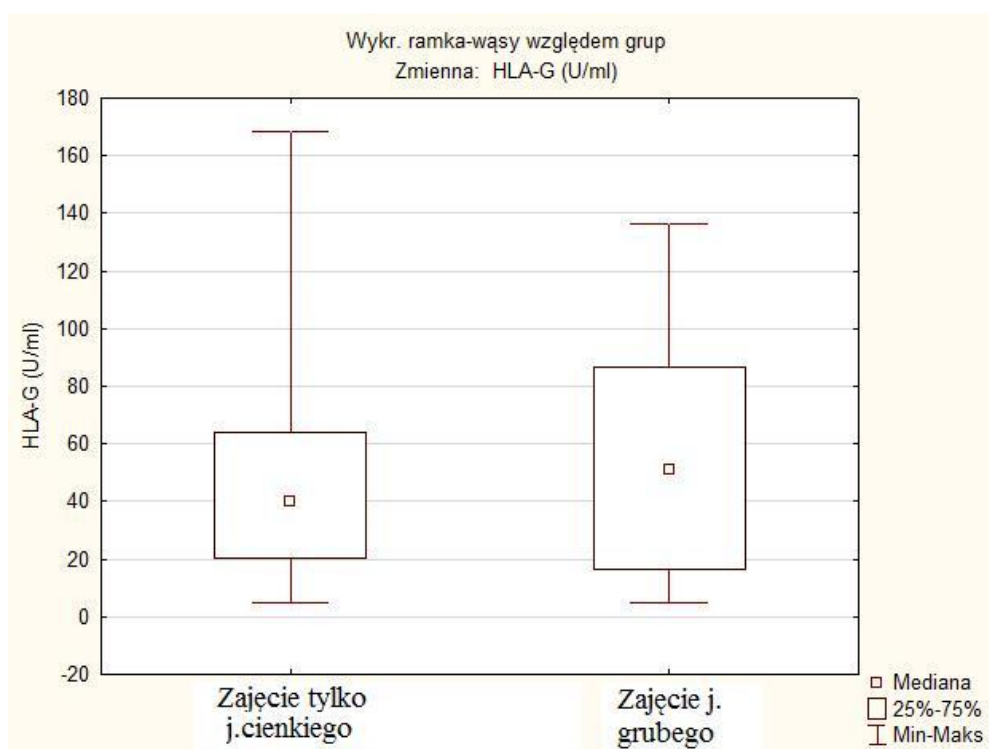
4.3.6. sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem lokalizacji zmian zapalnych

Poddano analizie stężenia sHLA-G w surowicy badanych chorych z uwzględnieniem lokalizacji oraz rozległości zmian zapalnych w przebiegu NZJ (Tab.18,19). W grupie pacjentów z ChL-C porównywano stężenie sHLA-G u chorych ze zmianami ograniczonymi do jelita cienkiego z pacjentami, u których choroba przebiegała z zajęciem jelita grubego. Stężenia sHLA-G w surowicy pobranej od chorych ze zmianami zapalnymi jedynie w jelicie cienkim były nieco wyższe niż u pacjentów, u których proces zapalny obejmował również jelito grube (51,3 U/ml vs 40 U/ml), nie stwierdzono jednak istotności statystycznej ($p=0,35$) (Ryc.41).

Tabela 18. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem lokalizacji zmian
zapalnych w ChL-C

	Zajęcie tylko j.cienkiego (U/ml) (średnia±SD)	Zajęcie tylko j.cienkiego (U/ml) (mediana)	Zajęcie j. grubego (U/ml) (średnia±SD)	Zajęcie j. grubego (U/ml) (mediana)	p
ChL-C	56,3±41	51,3	45,8±36,6	40	0,35

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya



Rycina 41. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z ChL-C ograniczonym do j.cienkiego i przebiegającego z zajęciem j.grubego

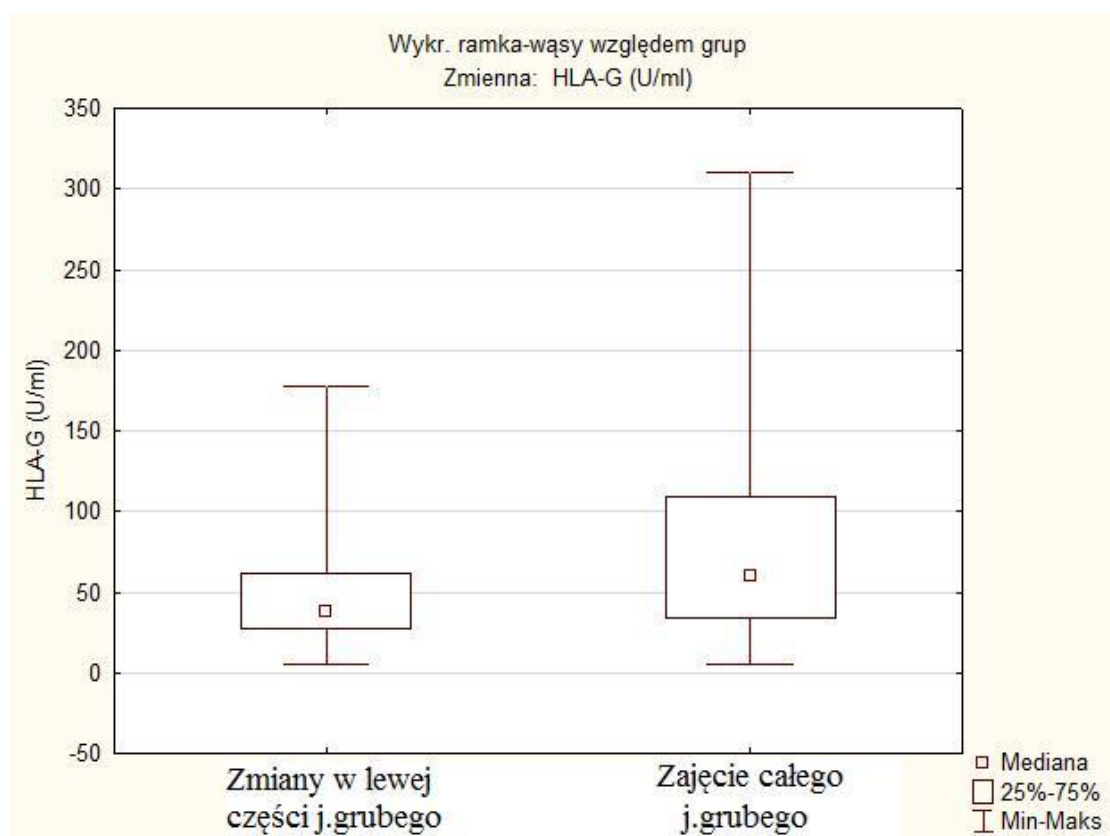
W grupie chorych na WZJG porównano stężenia sHLA-G w surowicy krwi pobranej od pacjentów ze zmianami zapalnymi ograniczonymi do lewej części jelita grubego (do zagięcia śledzionowego) oraz od chorych z zajęciem całego jelita grubego. Stężenie sHLA-G w grupie pacjentów ze zmianami zapalnymi obejmującymi całe jelito

grube było wyższe niż wśród chorych z chorobą ograniczoną do lewej części okrężnicy (59,6 U/ml vs 37,7 U/ml), jednak nie stwierdzono istotności statystycznej tych różnic ($p=0,16$) (Ryc.42).

Tabela 19. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem rozległości procesu zapalnego w WZJG

	Zmiany w lewej części j.grubego (U/ml) (średnia $\pm$ SD)	Zmiany w lewej części j.grubego (U/ml) (mediana)	Zajęcie całego j.grubego (U/ml) (średnia $\pm$ SD)	Zajęcie całego j.grubego (U/ml) (mediana)	p
WZJG	62,2 $\pm$ 61,4	37,7	59,76 $\pm$ 42,4	59,6	0,16

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya



Rycina 42. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem rozległości procesu zapalnego w WZJG

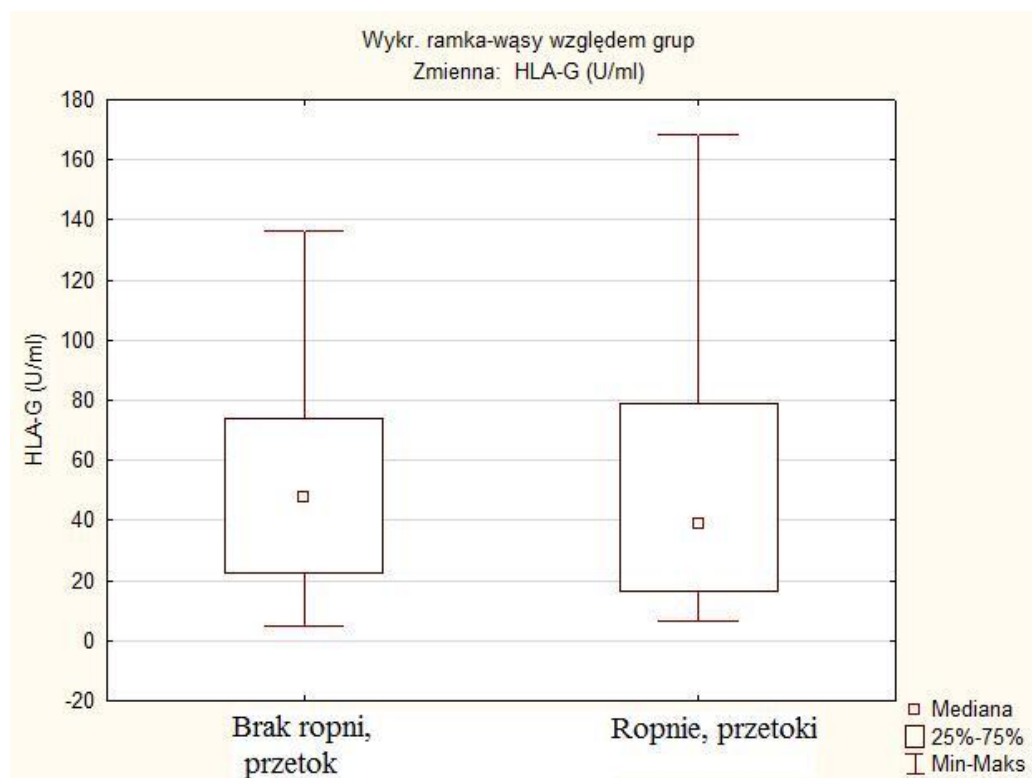
4.3.7. sHLA-G w surowicy chorych na ChL-C z uwzględnieniem powikłań choroby

Chorzy na ChL-C prezentujący powikłania przewlekłego procesu zapalnego, takie jak ropnie i przetoki, mieli nieco niższe stężenie sHLA-G w surowicy niż pacjenci bez takich zmian (39,1 U/ml vs 47,9 U/ml) (Tab.20). Nie stwierdzono jednak istotności statystycznej różnic (Ryc.43).

Tabela 20. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem obecności ropnie lub przetoki w grupie chorych na ChL-C

	Brak ropni, przetok (U/ml) (średnia±SD)	Brak ropni, przetok (U/ml) (mediana)	Ropnie, przetoki (U/ml) (średnia±SD)	Ropnie, przetoki (U/ml) (mediana)	p
ChL-C	53,3±38	47,9	50,6±42,2	39,1	0,67

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya



Rycina 43. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem powikłań procesu zapalnego w ChL-C

Przeprowadzono analizę stężenia sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem przebytego zabiegu operacyjnego z powodu ChL-C, nie stwierdzając istotnych różnic pomiędzy tymi grupami (Tab.21).

Tabela 21. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem przebiecia zabiegów operacyjnych z powodu ChL-C

	Nieoperowani (U/ml) (średnia±SD)	Nieoperowani (U/ml) (mediana)	Operowani (U/ml) (średnia±SD)	Operowani (U/ml) (mediana)	p
ChL-C	55,4±41,2	49,6	50,1±38,6	47,1	0,71

Objaśnienia: test U Manna-Whitneya

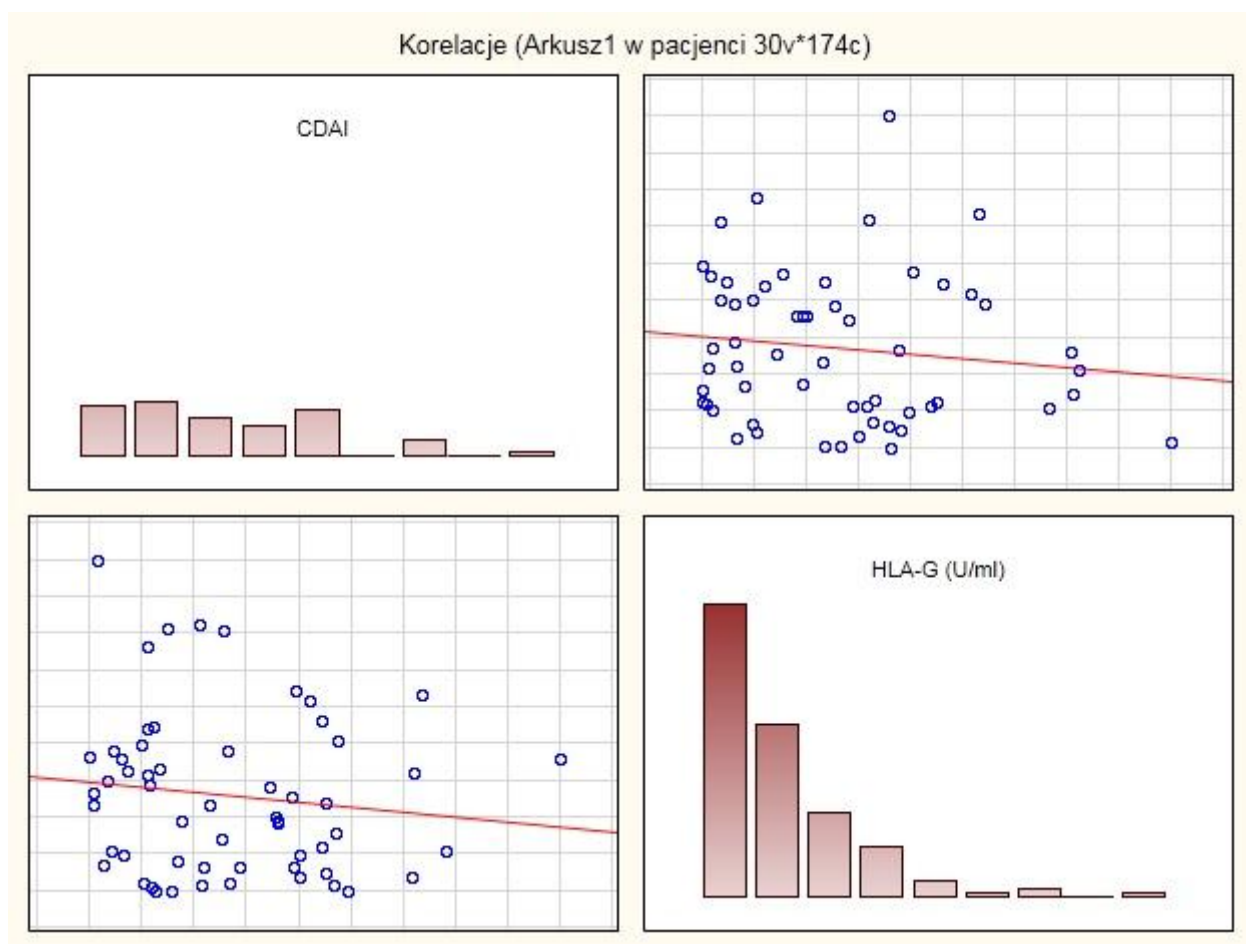
4.3.8. Korelacja pomiędzy sHLA-G a wartością CDAI w grupie chorych na ChL-C

Zbadano korelację pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy krwi a nasileniem procesu zapalnego w przebiegu ChL-C, wyrażonego za pomocą CDAI. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności (Tab.22; Ryc.44).

Tabela 22. Korelacja Spearmana pomiędzy wartościami sHLA-G w surowicy oraz CDAI.

	sHLA-G (R)
CDAI	-0,15

Objaśnienia: * - $p < 0,05$



Rycina 44. Korelacja Spearmana pomiędzy wartościami sHLA-G w surowicy oraz CDAI.

4.3.9. Korelacje pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy a wiekiem, czasem trwania choroby oraz wynikami badań biochemicznych

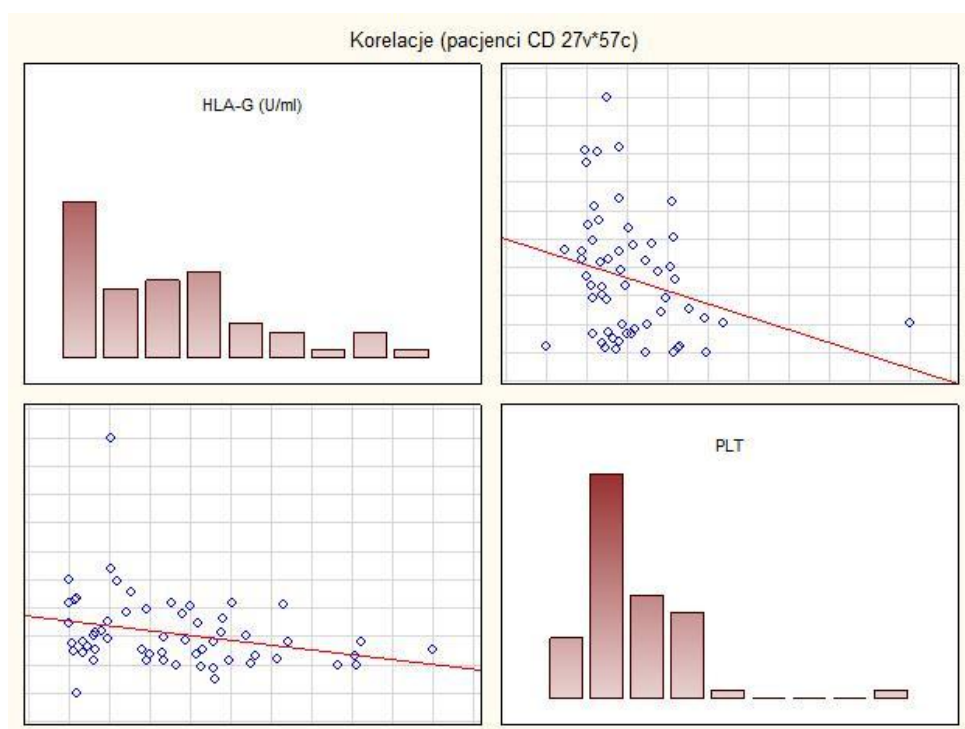
Przeprowadzono korelację metodą Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy krwi a wiekiem pacjentów, czasem trwania choroby oraz wynikami badań biochemicznych.

Stwierdzono istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy i liczbą płytek krwi w grupie pacjentów z ChL-C, a także pomiędzy stężeniem sHLA-G a stężeniem żelaza i CRP w grupie kontrolnej (Tab.23; Ryc.45,46,47).

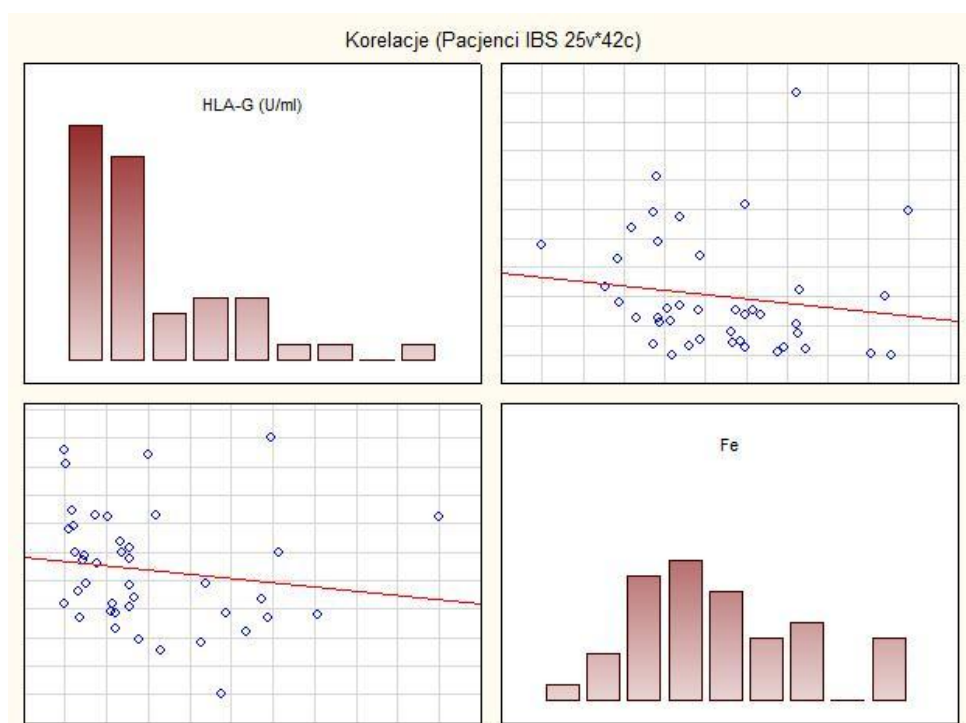
Tabela 23. Korelacje Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz parametrów biochemicznych w badanych grupach

	Ogółem (R)	ChL-C (R)	WZJG (R)	Kontrola (R)
Wiek	-0,06	0,004	-0,06	-0,06
Czas trwania	0,1	0,24	-0,06	
WBC	-0,07	-0,11	-0,06	0,008
RBC	-0,065	-0,027	-0,1	-0,15
HGB	-0,01	0,07	-0,05	-0,12
HCT	-0,025	0,075	-0,05	-0,16
PLT	-0,048	-0,32 *	0,2	0,014
Albumina	0,06	0,18	-0,02	0,05
Białko	0,005	0,09	-0,05	-0,04
Żelazo	-0,08	-0,07	0,07	-0,31*
CRP	0,09	-0,02	0,03	0,39 *

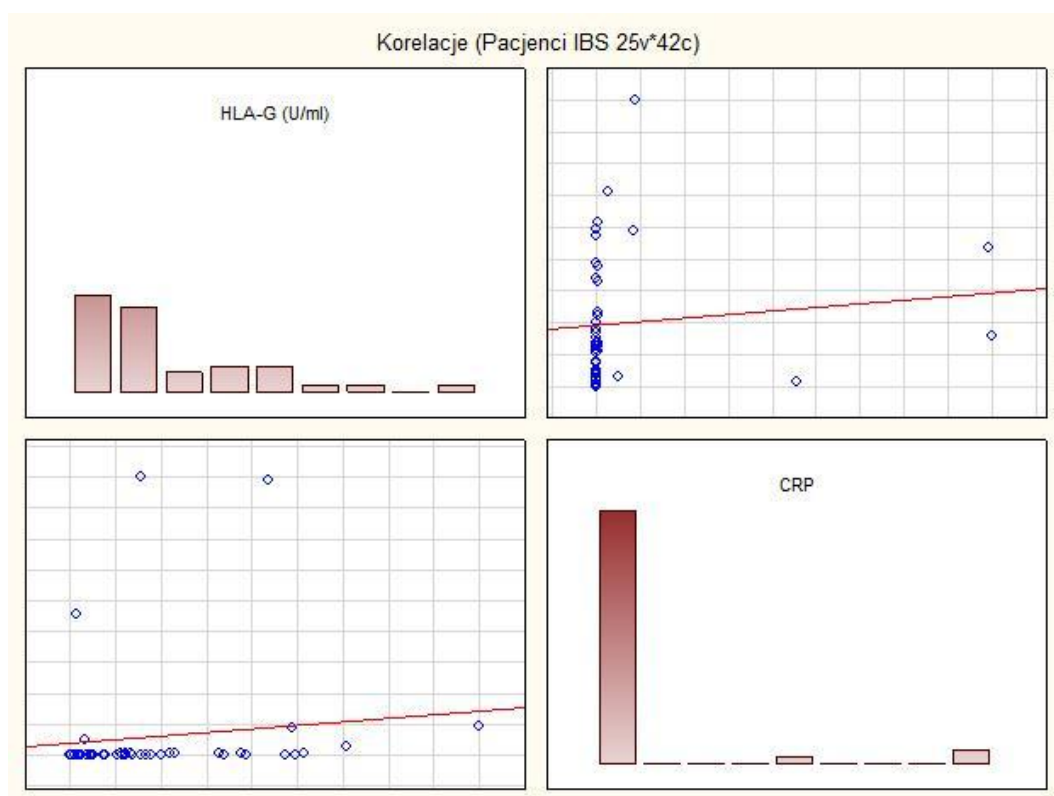
Objaśnienia: * - $p < 0,05$



Rycina 45. Korelacja Spearmana pomiędzy sHLA-G w surowicy oraz liczbą płytek krwi w grupie chorych na ChL-C



Rycina 46. Korelacja Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz żelaza w surowicy w grupie kontrolnej



Rycina 47. Korelacja Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz CRP w surowicy w grupie kontrolnej

5. Dyskusja

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) należą do chorób o nie do końca poznanej etiopatogenezie, w których podatność genetyczna, zaburzenia immunologiczne i wpływy środowiskowe odgrywają istotną rolę. Choroby te stanowią narastający problem w krajach rozwiniętych i rozwijających się, zarówno medyczny, jak i socjoekonomiczny [101]. Ze względu na swój przewlekły charakter oraz potencjalnie poważny przebieg, obarczony wieloma powikłaniami, mogą znacznie upośledzać jakość życia chorych, a także ich funkcjonowanie w społeczeństwie. Dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za patologiczny proces zapalny w NZJ może pozwolić na zwiększenie skuteczności leczenia tych chorób, uzyskanie dłuższych okresów wyciszenia objawów oraz poprawę jakości życia chorych.

Badany w niniejszej pracy antygen HLA-G, ze względu na swoją rolę w osiągnięciu i utrzymaniu stanu immunologicznej tolerancji, stał się obiektem zainteresowania badaczy, próbujących wyjaśnić jego znaczenie w rozwoju i podtrzymaniu zmian zapalnych w przebiegu ChL-C oraz WZJG [14,89,115]. W dotychczasowych, nielicznych badaniach, stwierdzono nasiloną produkcję tkankowego antygeny HLA-G w błonie śluzowej jelita grubego chorych na WZJG [115]. Natomiast badania te nie wykazały ekspresji tego antygeny w błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C oraz w grupie kontrolnej [115]. Nie obserwowano również różnic w rozmieszczeniu HLA-G w błonie komórkowej komórek błony śluzowej jelita grubego w zależności od nasilenia zmian zapalnych, a także miejsca pobrania biopsji [115].

Dotychczasowe badania nad znaczeniem rozpuszczalnego antygeny HLA-G w NZJ prowadzono głównie w hodowlach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) [89,131]. Autorzy stwierdzili wysoką zdolność PBMC pobranych od chorych na ChL-C do produkcji sHLA-G, natomiast sekrecja tego antygeny przez PBMC

uzyskane od pacjentów z WZJG była minimalna, nawet po stymulacji bakteryjnym lipopolisacharydem [89]. Inni badacze wykryli również bezpośrednią korelację pomiędzy stężeniem sHLA-G w hodowlach PBMC a jego stężeniem w surowicy krwi u chorych na ChL-C i WZJG [131].

W niniejszym badaniu skupiono się nad określeniem zachowania się stężenia sHLA-G, jako istotnego antygeny w wielu reakcjach organizmu, w surowicy chorych na NZJ. Przeprowadzono badanie potencjalnych różnic pomiędzy ekspresją sHLA-G zarówno u chorych na ChL-C, jak i WZJG. Podjęto także próbę określenia, czy aktywność procesu zapalnego w NZJ bądź stosowane leczenie może wpływać na zachowanie się sHLA-G w surowicy chorych. Opierając się na wynikach dotychczasowych badań, można było bowiem założyć, że wartości stężenia sHLA-G w surowicy pacjentów z ChL-C mogą być wyższe, ze względu na zdolność PBMC tych chorych do ich dużej produkcji i w efekcie pomiary sHLA-G mogą okazać się przydatne w diagnostyce różnicowej [89]. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania nie wykazały jednak istotnych statystycznie różnic w zachowaniu się stężenia sHLA-G w surowicy między chorymi na ChL-C i WZJG a także grupą kontrolną.

Analizując wyniki oznaczeń stężenia sHLA-G w surowicy chorych na NZJ z uwzględnieniem stosowanego u tych pacjentów leczenia immunosupresyjnego, można było zauważyć, że stężenie sHLA-G w surowicy tych chorych zarówno w trakcie terapii immunosupresyjnej, jak i nie otrzymujących takiego leczenia było bardzo zbliżone, to jednak obserwowano wyraźne, przeciwstawne różnice w zachowaniu się sHLA-G w grupie chorych na ChL-C i WZJG.

Na podstawie niniejszych badań można przypuszczać, że leczenie immunosupresyjne obniża produkcję lub wydzielanie do krwi sHLA-G u chorych na WZJG, natomiast może zwiększać ją w ChL-C. Leczenie to może prowadzić do zatarcia

ewentualnych różnic w sekrecji sHLA-G u chorych na ChL-C i WZJG. Obserwowane w niniejszych badaniach trendy mogą wynikać z innego charakteru procesu zapalnego w badanych chorobach. W przypadku WZJG przeważa bowiem nietypowa reakcja zapalna z udziałem limfocytów typu Th2. Reakcja ta przebiega ze znacznie zwiększonym wydzielaniem wielu cytokin, między innymi IL-10 [68]. Jak wykazali w swoich badaniach Urosevic i Dummer, IL-10 pobudza produkcję HLA-G [120]. Stąd można przypuszczać, że zastosowanie terapii immunosupresyjnej oraz zmniejszenie zmian zapalnych w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na NZJ, a w konsekwencji mniejsza sekrecja IL-10, mogą w efekcie powodować obserwowany w niniejszych badaniach spadek stężenia sHLA-G w surowicy krwi chorych. Natomiast u chorych na ChL-C proces zapalny przebiega z nadmierną aktywacją limfocytów typu Th1 [84]. Leczenie immunosupresyjne u tych chorych, przywracając stan równowagi pomiędzy limfocytami Th1 i Th2, mogłoby powodować wzrost stężenia sHLA-G.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że powyższe obserwacje stoją w sprzeczności z dotychczasowymi doniesieniami dotyczącymi wpływu leczenia immunosupresyjnego na produkcję sHLA-G. I tak Zelante i wsp. w dwuetapowym badaniu stwierdzili, że terapia immunosupresyjna normalizuje produkcję sHLA-G przez PBMC pobrane od chorych na NZJ [131]. Autorzy ci wykazali, że leczenie to w modelach badań *in vitro* zmniejszało nadprodukcję sHLA-G w ChL-C, zaś przywracało sekrecję tego antygeny w WZJG [131]. Ponadto Zelante i wsp. podali również, że potwierdzili dodatnią korelację pomiędzy produkcją sHLA-G przez PBMC a jego stężeniem w surowicy krwi u chorych na NZJ [131]. Obserwowane w tych badaniach trendy w zakresie zachowania się sHLA-G w hodowli i w surowicy krwi należy traktować z dużą ostrożnością, tym bardziej, że korelacja została wykazana jedynie w grupie pacjentów stosujących leki immunosupresyjne [131]. Trudno jest też stwierdzić,

czy w przypadku organizmu nie poddanego działaniu terapii modyfikującej funkcję układu immunologicznego, również może zachodzić bezpośrednia korelacja pomiędzy produkcją sHLA-G przez PBMC a jego stężeniem w surowicy krwi obwodowej. Należy też dodać, że w sprawozdaniu z drugiego etapu omawianych badań, Zelante i wsp. podają, że do pierwszego etapu badania zakwalifikowano chorych nie otrzymujących leków immunosupresyjnych, natomiast z charakterystyki badanej wówczas grupy wynika, że większość pacjentów była w trakcie glikortykosteroidoterapii [89,131]. Powinniśmy jednak zauważyć, że brak szczegółów na temat rodzaju leczenia otrzymywanego przez chorych na NZJ zakwalifikowanych do drugiego etapu badania, utrudnia interpretację i odniesienie się do jego wyników [131].

Zarówno pośród chorych na ChL-C, jak i na WZJG, stwierdzono w niniejszych badaniach wyraźnie niższe stężenie sHLA-G w surowicy pacjentów w aktywnej fazie tych chorób w porównaniu do osób pozostających w okresie remisji. Obserwowany trend w zachowaniu się może wskazywać, że HLA-G pełni, jakkolwiek nie poznaną jeszcze, rolę w regulacji procesu zapalnego w NZJ. Możliwe jest też, że spostrzeżenie to może mieć znaczenie w interpretacji ograniczenia zmian chorobowych w przebiegu NZJ, bądź w podtrzymaniu remisji, co wcześniej zostało udowodnione na grupie innych chorób o podłożu immunologicznym, a mianowicie w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów, astmy oskrzelowej czy stwardnienia rozsianego [31,88,125]. Ponieważ w niniejszych badaniach nie potwierdzono istotności statystycznej opisywanych różnic u chorych na ChL-C i WZJG, należy więc omawiane wyniki traktować z pewną ostrożnością.

Omawiając uzyskane w niniejszych badaniach wyniki sądzimy, że bardzo interesująca wydaje się być analiza zachowania się stężeń sHLA-G w surowicy chorych na NZJ z uwzględnieniem stopnia aktywności choroby oraz stosowanego leczenia

immunosupresyjnego. Wyniki te bowiem sugerują, że wpływ leczenia immunosupresyjnego na stężenie sHLA-G w surowicy chorych zależy nie tylko od rodzaju NZJ, ale również od aktywności procesu zapalnego w przewodzie pokarmowym tych pacjentów. Wydaje się, że opisane powyżej różnice w stężeniu sHLA-G w zależności od terapii immunosupresyjnej dotyczą głównie chorych w okresie zaostrzenia zarówno ChL-C, jak i WZJG, ponieważ w przypadku pacjentów pozostających w okresie remisji można było zauważyć odwrotny trend, a mianowicie zmniejszenie sekrecji sHLA-G po zastosowaniu immunosupresji w ChL-C oraz zwiększenie w WZJG. Takie spostrzeżenia mogą wyjaśniać niezgodność wyników niniejszego badania z wcześniejszymi doniesieniami, zwłaszcza, że nieliczni autorzy badający te zależności w NZJ nie udostępnili informacji w publikacjach na temat stopnia aktywności NZJ u badanych chorych [89,131]. Potwierdzenie powyższych danych oraz wyjaśnienie obserwowanych zależności z pewnością wymagają dodatkowych badań. Szczególnie wydaje się być istotne uzyskanie większej ilości danych na temat zachowania się sHLA-G u pacjentów z ciężkim zaostrzeniem NZJ, których jednak do niniejszego badania nie zakwalifikowano.

Omawiając wyniki niniejszego badania, należy zwrócić szczególną uwagę na wyraźną, istotną statystycznie, różnicę w zachowaniu się stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy chorymi z zaostrzeniem ChL-C i WZJG, którzy nie otrzymywali leczenia immunosupresyjnego. Spostrzeżenia te sugerują, że w przypadku naturalnego, nie modyfikowanego immunosupresją, przebiegu WZJG w trakcie zaostrzenia objawów produkcja sHLA-G jest znacznie większa niż u chorych na ChL-C. Można przypuszczać, że nadmiar sHLA-G u tych chorych mógłby być próbą ograniczenia i zahamowania patologicznej reakcji zapalnej przez organizm lub wtórnym efektem nadprodukcji cytokiny IL-10, w przeważającej w WZJG nietypowej reakcji typu Th2

[68]. Taka próba interpretacji uzyskanych wyników i różnic pomiędzy WZJG i ChL-C pozostaje w zgodności z wcześniejszymi doniesieniami Torresa i wsp. o wysokiej ekspresji tkankowego HLA-G w błonie śluzowej jelita grubego chorych na WZJG oraz brakiem obecności tego antygeny w biopsjach pobranych od pacjentów z ChL-C [115].

W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono istotnych statystycznie powiązań pomiędzy lokalizacją i rozległością zmian zapalnych w przebiegu ChL-C i WZJG a zarówno stężeniem sHLA-G w surowicy, jak i ekspresją tkankowego HLA-G w błonie śluzowej jelita grubego [115,131]. Również w niniejszym badaniu nie udowodniono takiego związku, jednak podobnie jak w przypadku zależności z leczeniem immunosupresyjnym i aktywnością choroby, dały się zauważyć pewne różnice pomiędzy badanymi grupami. Wśród chorych na ChL-C większa rozległość zmian wiązała się bowiem z nieco niższym stężeniem sHLA-G w surowicy, natomiast u pacjentów z WZJG przebiegającym z zajęciem całego jelita grubego, stężenie sHLA-G było wyższe niż u chorych ze zmianami ograniczonymi do lewej części jelita grubego. Mogłoby to potwierdzać przypuszczenia, że w naturalnym przebiegu ChL-C obserwujemy spadek stężenia sHLA-G wraz ze wzrostem aktywności patologicznego procesu zapalnego, natomiast w przypadku WZJG stężenie sHLA-G wzrasta wraz z nasileniem i rozległością choroby. W pewnym stopniu przemawia za tym również obserwowana, istotna statystycznie, ujemna korelacja pomiędzy liczbą płytek krwi a stężeniem sHLA-G w grupie chorych na ChL-C. Podwyższona liczba płytek krwi jest bowiem zwykle obecna u chorych z przewlekłym procesem zapalnym, charakterystycznym dla ChL-C [107]. Nadpłytkowość w badanej populacji chorych na NZJ obserwowano w niniejszym badaniu zarówno u pacjentów w fazie zaostrzenia, jak i remisji ChL-C.

Należy sądzić, że ważne dla interpretacji wyników niniejszego badania jest stwierdzenie w grupie kontrolnej statystycznie istotnej dodatniej korelacji stężenia CRP i sHLA-G w surowicy oraz ujemnej zależności pomiędzy stężeniem żelaza i sHLA-G w surowicy. Te spostrzeżenia sugerują, że pomimo zastosowanych rygorystycznych kryteriów kwalifikacji do badania, w grupie kontrolnej mogły znaleźć się osoby ze stanami chorobowymi, które mogły wpłynąć na stężenie sHLA-G w surowicy. Ze względu na udokumentowany wpływ na stężenie sHLA-G w surowicy licznych chorób immunologicznych, zarówno tych o ciężkim przebiegu, na przykład stwardnienie rozsiane, ale także takich o stosunkowo łagodnych objawach, jak alergiczny katar sienny, oraz w dość częstych infekcjach wirusowych, takich jak zakażenie HSV-1 czy CMV, niezwykle trudno jest wykluczyć wpływ potencjalnych czynników zakłócających na uzyskane wyniki oznaczenia sHLA-G [31,57,71,80,128]. Szczególnie u osób chorych na NZJ, które są przewlekłymi chorobami o uciążliwych objawach, a także wiążą się z ryzykiem wystąpienia poważnych powikłań, można łatwo przeoczyć objawy innej choroby, czy to z powodu bagatelizowania problemu przez chorego, czy też niedostatecznej staranności w analizowaniu innych potencjalnych patologii i np. przewlekłych zakażeń wirusowych. Wynikiem tego może być obserwowany w niniejszej pracy bardzo duży rozrzut stężenia sHLA-G we wszystkich badanych grupach chorych, w tym także kontrolnej, od wartości poniżej 10 U/ml do wartości przekraczających 200 U/ml. Rozrzut wyników utrudnia ich interpretację, może doprowadzać do zatarcia różnic statystycznych w badanej populacji. Uważamy więc, że w dalszych badaniach, zmierzających do lepszego poznania znaczenia HLA-G w NZJ, będzie należało zachować szczególną staranność przy ustalaniu kryteriów włączenia i wyłączenia z badania, celem zminimalizowania wpływu szeregu czynników mogących zakłócać uzyskane wyniki i ich interpretację. W podsumowaniu omówienia niniejszej

pracy powinno się zauważyć, że możliwy wpływ wielu potencjalnych czynników na zachowanie się stężenia sHLA-G w surowicy krwi chorych na NZJ, stawia pod znakiem zapytania wartość sHLA-G, jako potencjalnego markera biochemicznego, służącego czy to do różnicowania między ChL-C i WZJG, czy do monitorowania i oceny aktywności NZJ.

6. Wnioski

Uzyskane wyniki badań upoważniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Stężenie sHLA-G w surowicy nie różni się istotnie pomiędzy chorymi na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego.
2. Chorzy na nieswoiste zapalenia jelit w trakcie aktywnej fazy choroby wykazują tendencję do niższego stężenia sHLA-G w surowicy niż pacjenci w fazie nieaktywnej choroby.
3. Leczenie immunosupresyjne w nieswoistych zapaleniach jelit wpływa na zachowanie się sHLA-G w surowicy chorych. W zaostrzeniu choroby Leśniowskiego-Crohna wartości sHLA-G są wyższe niż obserwowane w zaostrzeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.
4. Terapia immunosupresyjna w fazie nieaktywnej nieswoistych zapaleń jelit powoduje zmniejszenie stężenia sHLA-G w surowicy chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz zwiększenie stężenia sHLA-G u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego.
5. Chorzy z aktywną fazą choroby Leśniowskiego-Crohna nie leczeni immunosupresyjnie wykazują niższe wartości sHLA-G w porównaniu do wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.
6. Oznaczanie w surowicy sHLA-G nie pozwala na różnicowanie między chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

7. Streszczenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) są przewlekłymi chorobami przewodu pokarmowego o nie do końca poznanej etiopatogenezie, w której istotną rolę pełnią czynniki genetyczne, immunologiczne, środowiskowe i infekcyjne. Zaliczamy do nich chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG). Upośledzają one jakość życia chorych i wymagają przewlekłego leczenia.

HLA-G jest antygenem HLA klasy I charakteryzującym się niskim polimorfizmem alleli, ograniczoną dystrybucją w tkankach oraz obecnością siedmiu izoform: trzech rozpuszczalnych oraz czterech tkankowych. Udokumentowano zróżnicowaną prezentację izoform antygeny HLA-G w wielu chorobach autoimmunologicznych, zakażeniach wirusowych i chorobach nowotworowych. Ich obecność jest powiązana z tolerancją przeciwko komórkowym reakcjom odpornościowym.

Celem niniejszej pracy była ocena zachowania się stężeń rozpuszczalnego antygeny HLA-G w surowicy krwi u chorych na ChL-C i WZJG, ustalenie zależności pomiędzy stężeniem sHLA-G w surowicy a stopniem aktywności NZJ oraz stosowanym leczeniem, a także określenie, czy oznaczanie w surowicy antygeny HLA-G może być potencjalnym markerem biochemicznym, pomocnym w różnicowaniu ChL-C i WZJG.

Badaniem objęto 150 chorych leczonych w Oddziale Klinicznym Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, w tym 57 chorych na ChL-C i 51 pacjentów z WZJG. Grupę kontrolną stanowiły 42 osoby z rozpoznaniem zespołem jelita nadwrażliwego. Rozpoznanie NZJ stawiano na podstawie kryteriów klinicznych, endoskopowych, histologicznych, immunologicznych i obrazowych. U wszystkich badanych wykonywano oznaczenie morfologii, stężenia

albumin, białka całkowitego, żelaza oraz CRP w surowicy krwi. Stężenie sHLA-G w surowicy oznaczano metodą ELISA.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu sHLA-G w surowicy pomiędzy chorymi na ChL-C, WZJG i grupą kontrolną. Zaobserwowano wyraźny wpływ leczenia immunosupresyjnego na stężenie sHLA-G u chorych z NZJ w trakcie nasilenia objawów choroby. Pacjenci z zaostrzeniem ChL-C leczeni immunosupresyjnie mieli wyższe stężenia sHLA-G (69,9 U/ml vs 32,5 U/ml, $p=0,03$), natomiast chorzy z zaostrzeniem WZJG mieli niższe stężenia sHLA-G niż pacjenci nie poddani takiej terapii (34,9 U/ml vs 57 U/ml, $p=0,047$). Stwierdzono również znacznie niższe stężenia sHLA-G w trakcie naturalnego przebiegu zaostrzenia ChL-C niż w przypadku WZJG (32,5 U/ml vs 57 U/ml, $p=0,026$).

Znacznym utrudnieniem dla interpretacji uzyskanych wyników był bardzo duży rozrzut ich wartości, od poniżej 10 U/ml do ponad 200 U/ml we wszystkich badanych grupach, wynikający prawdopodobnie z wpływu trudnych do wyeliminowania na etapie kwalifikacji do badania czynników zakłócających, jak np. bezobjawowych zakażeń wirusowych. Trudności te stawiają pod znakiem zapytania wartość sHLA-G, jako potencjalnego markera biochemicznego, służącego czy to do różnicowania między ChL-C i WZJG, czy do monitorowania i oceny aktywności NZJ.

Uzyskane wyniki badań upoważniają do wyciągnięcia następujących wniosków: stężenie sHLA-G w surowicy nie różni się istotnie pomiędzy chorymi na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego; chorzy na nieswoiste zapalenie jelit w trakcie aktywnej fazy choroby wykazują tendencję do niższego stężenia sHLA-G w surowicy niż pacjenci w fazie nieaktywnej choroby; leczenie immunosupresyjne w nieswoistych zapaleniach jelit wpływa na zachowanie się sHLA-G w surowicy chorych, w zaostrzeniu choroby Leśniowskiego-Crohna wartości sHLA-

G są wyższe niż obserwowane w zaostrzeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego; terapia immunosupresyjna w fazie nieaktywnej nieswoistych zapaleń jelit powoduje zmniejszenie stężenia sHLA-G w surowicy chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz zwiększenie stężenia sHLA-G u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego; chorzy z aktywną fazą choroby Leśniowskiego-Crohna nie leczeni immunosupresyjnie wykazują niższe wartości sHLA-G w porównaniu do wrzodziejącego zapalenia jelita grubego; oznaczanie w surowicy sHLA-G nie pozwala na różnicowanie między chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

8. Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic disorders of digestive tract. Their etiopathogenesis is unknown, but genetic, immunological, environmental and infectious factors play important role. They include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBD impair patients quality of life and require chronic treatment.

HLA-G is a HLA-I class antigen, characterized by low allele polymorphism, limited tissue distribution and presence of seven isoforms: three soluble and four membrane-bound. Different expression of HLA-G antigen isoforms was well documented in many autoimmune, infectious and neoplastic diseases. It is connected with tolerance state against cellular immunological reactions.

The aim of this study was to evaluate levels of sHLA-G in serum of patients with CD and UC, to determine the relationship between sHLA-G in serum and the degree of activity of IBD and treatment, and also to determine whether the evaluation of sHLA-G can be a potential biochemical marker, useful in the differentiation between CD and UC.

We enrolled to the study 150 patients treated at the Clinical Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital in Krakow, including 57 patients with CD, and 51 patients with UC. Control group consisted of 42 patients with the irritable bowel syndrome. The diagnosis of IBD was made on the basis of generally accepted clinical, endoscopic, histological, immunological and imaging criteria. In all subjects blood morphology, albumin, total protein, iron and CRP levels in serum were assessed. sHLA-G concentration in serum was determined by ELISA test.

The differences in sHLA-G concentration in serum were found not statistically significant in patients with CD, UC and control group. There was a clear effect of immunosuppressive therapy on the concentration of sHLA-G in patients with active

phase of disease. Patients with exacerbation of CD treated with immunosuppressive therapy had higher levels of sHLA-G (69.9 U/ml vs 32.5 U/ml, $p = 0.03$), whereas patients with exacerbation of UC had lower levels of sHLA-G (34.9 U/ml vs 57 U/ml, $p = 0.047$) than patients without such therapy. It was also found that during the natural course of exacerbations levels of sHLA-G were significantly lower in patients with CD compared to UC (32.5 U/ml vs 57 U/ml, $p = 0.026$).

The large range of sHLA-G of values, from less than 10 U/ml to over 200 U/ml in all groups, was significant complication for the interpretation of the results. It was probably due to impact of difficult to eliminate confounding factors, such as asymptomatic viral infections. These difficulties call into question the value of sHLA-G, as a potential biochemical marker, used either to differentiate between the CD and UC, or to monitor and evaluate the activity of IBD.

Our results justify the following conclusions: concentrations of sHLA-G in serum do not significantly differ between patients with Crohn's disease and ulcerative colitis; patients with inflammatory bowel disease during the active phase of the disease have a tendency to lower concentrations of sHLA-G in serum than patients in the inactive phase of disease; immunosuppressive therapy in inflammatory bowel disease impacts level of sHLA-G in serum, concentration of sHLA-G in patients with exacerbation of Crohn's disease are higher than in ulcerative colitis patients; immunosuppressive therapy in the inactive phase of inflammatory bowel disease decrease the concentration of sHLA-G in the serum of Crohn's disease patients and increase the concentration of sHLA-G in ulcerative colitis patients; patients in active phase of Crohn's disease without immunosuppressive therapy have lower levels of sHLA-G in serum than ulcerative colitis patients; determination of serum sHLA-G is not useful for the differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis.

8. Spis tabel

Tabela 1. Wskaźnik aktywności ChL-C (CDAI) [127]

Tabela 2. Klasyfikacja Montrealska rozległości WZJG [129]

Tabela 3. Skala aktywności WZJG wg ECCO [129]

Tabela 4. Wartości referencyjne badań biochemicznych i morfologii krwi

Tabela 5. Charakterystyka badanych grup chorych

Tabela 6. Charakterystyka chorych z ChL-C i WZJG

Tabela 7. Lokalizacja zmian zapalnych w jelitach u chorych na chorobę
Leśniowskiego–Crohna

Tabela 8. Rozległość zmian we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

Tabela 9. Wyniki badań analitycznych w badanych grupach chorych.

Tabela 10. Wyniki oznaczenia sHLA-G w grupach chorych

Tabela 11. Stężenie sHLA-G w surowicy w badanych grupach z uwzględnieniem płci
chorych

Tabela 12. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem stopnia aktywności
choroby

Tabela 13. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem leczenia
immunosupresyjnego (glikortykosteroidy lub azatiopryna)

Tabela 14. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem leczenia immunosupresyjnego azatiopryną

Tabela 15. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych z ChL-C w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Tabela 16. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych z WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Tabela 17. Porównanie stężeń sHLA-G w surowicy krwi chorych na ChL-C i WZJG w zależności od stosowanego leczenia i aktywności choroby

Tabela 18. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem lokalizacji zmian zapalnych w ChL-C

Tabela 19. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem rozległości procesu zapalnego w WZJG

Tabela 20. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem obecności ropnie lub przetoki w grupie chorych na ChL-C

Tabela 21. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem przebycia zabiegów operacyjnych z powodu ChL-C

Tabela 22. Korelacja Spearmana pomiędzy wartościami sHLA-G w surowicy oraz CDAI.

Tabela 23. Korelacje Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz parametrów biochemicznych w badanych grupach

9. Spis rycin

Rycina 1. Krzywa kalibracyjna sHLA-G, oznaczenie z maja 2011 r.

Rycina 2. Krzywa kalibracyjna sHLA-G, oznaczenie ze stycznia 2012 r.

Rycina 3. Stężenie CRP (mg/l) w surowicy chorych na ChL-C w fazie zaostrzenia i remisji

Rycina 4. Stężenie hemoglobiny (g/dl) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 5. Hematokryt (%) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 6. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 7. Stężenie albumin (g/l) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 8. Stężenie żelaza ($\mu\text{mol/l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 9. Liczba leukocytów ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 10. Stężenie białka całkowitego (g/l) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 11. Liczba erytrocytów ($\times 10^6/\mu\text{l}$) u chorych na ChL-C i w grupie kontrolnej

Rycina 12. Liczba leukocytów we krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 13. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 14. Stężenie CRP w surowicy (mg/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 15. Stężenie hemoglobiny (g/dl) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 16. Hematokryt (%) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 17. Stężenie albumin w surowicy (g/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 18. Stężenie żelaza w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 19. Liczba erytrocytów we krwi ($\times 10^6/\mu\text{l}$) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 20. Stężenie białka całkowitego w surowicy (g/l) u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

Rycina 21. Stężenie hemoglobiny we krwi (g/dl) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

Rycina 22. Hematokryt we krwi (%) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

Rycina 23. Stężenie albuminy w surowicy (g/l) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

Rycina 24. Stężenie żelaza w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

Rycina 25. Liczba płytek krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$) u chorych w remisji ChL-C i WZJG

Rycina 25. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie chorych na ChL-C

Rycina 26. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie chorych na WZJG

Rycina 27. Rozkład wyników oznaczenia sHLA-G w surowicy w grupie kontrolnej

Rycina 28. Porównanie rozkładu stężenia sHLA-G w surowicy chorych na ChL-C i WZJG

Rycina 29. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w badanej populacji

Rycina 30. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie chorych na ChL-C

Rycina 31. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie chorych na WZJG

Rycina 32. Stężenie sHLA-G w surowicy względem płci w grupie kontrolnej

Rycina 33. Stężenie sHLA-G w surowicy względem aktywności ChL-C

Rycina 34. Stężenie sHLA-G w surowicy względem aktywności WZJG

Rycina 35. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z NZJ leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie

Rycina 36. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z ChL-C leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie

Rycina 37. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z WZJG leczonymi i nie leczonymi immunosupresyjnie

Rycina 38. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem ChL-C w zależności od stosowanego leczenia. Różnica znamionna statystycznie $p=0,03$

Rycina 39. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem WZJG w zależności od stosowanego leczenia. Różnica znamionna statystycznie $p=0,047$

Rycina 40. Stężenia sHLA-G w surowicy chorych z zaostrzeniem ChL-C i WZJG, nie otrzymujących leczenia immunosupresyjnego. Różnica znamionowa statystycznie $p=0,026$

Rycina 41. Porównanie stężenia sHLA-G w surowicy pomiędzy pacjentami z ChL-C ograniczonym do j.cienkiego i przebiegającego z zajęciem j.grubego

Rycina 42. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem rozległości procesu zapalnego w WZJG

Rycina 43. Stężenie sHLA-G w surowicy z uwzględnieniem powikłań procesu zapalnego w ChL-C

Rycina 44. Korelacja Spearmana pomiędzy wartościami sHLA-G w surowicy oraz CDAI.

Rycina 45. Korelacja Spearmana pomiędzy sHLA-G w surowicy oraz liczbą płytek krwi w grupie chorych na ChL-C

Rycina 46. Korelacja Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz żelaza w surowicy w grupie kontrolnej

Rycina 47. Korelacja Spearmana pomiędzy stężeniem sHLA-G oraz CRP w surowicy w grupie kontrolnej

11. Piśmiennictwo

1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009;361:2066-78
2. Apps R, Gardner L, Moffer A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol.* 2008;29:313-21
3. Aractingi S, Briand N, Le Danff C, Viguier M, Bachelez H, Michel L, Dubertret L, Carosella ED. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol.* 2001;159:7107
4. Bamias G, Kaltsa G, Ladas SD. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Discov Med.* 2011;11:459-67
5. Bartnik W. Choroby wewnętrzne. Red. Szczeklik A. *Medycyna Praktyczna,* 2010 Kraków:811-838
6. Behr MA. The path to Crohn's disease: is mucosal pathology a secondary event? *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:896-902
7. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA.* 2011;285:643-647
8. Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:300-311
9. Braus NA, Elliott DE. Focus on focus: advances in the pathogenesis and treatment of IBD. *Clin Immunol.* 2009;132:1-9
10. Brunner T. Living on the edge: immune cells and immunopathology in the intestinal mucosa. *Semin Immunopathol.* 2009;31:143-144

11. Caprilli R, Frieri G. The dyspeptic macrophage 30 years later: an update in the pathogenesis of Crohns disease. *Dig L Dis.* 2009;41:166-168
12. Carosella ED, LeMaoult J. HLA-G: a look back, a look forward. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:337-40
13. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252
14. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol.* 2008;29:125-32
15. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunology Letters.* 2011;138:22-24
16. Casanova JL, Abel L. revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med.* 2009;206:1839-1897
17. Caumartin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, LeMaoult J. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 2007;26:1423-1433
18. Cuffari C. The genetics of inflammatory bowel disease: diagnostic and therapeutic implications. *World J Pediatr.* 2010;6:203-209
19. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2011;365:1713-25
20. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004; 127:412-21.

21. De Hertogh G, Aerssens J, Geboes KP, Geboes K. Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:845-852
22. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 2003;134:120-126
23. Dendrinou S, Kalabalikis G, Makrakis E, Papasteriades C, Creatsas G, Katsorchis T. HLA-G in murine peripheral blood after interruption of pregnancy. *Cell Biol Int.* 2005;29:402-407
24. Dessein R, Chamaillard M, Danese S. Innate immunity in Crohn's Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42:S144-S147
25. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20:S1-S13
26. Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. Colonic explants production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 1998;112:435-442
27. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:369-395
28. Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, Gangneux JP. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:236-240

29. Downs-Kelly E, Schade AE, Hansel DE. The role of HLA-G in gastrointestinal inflammatory disease and malignancy. *Seminars in Cancer Biology*. 2007;17:451-458
30. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *AM J Gastroenterol*. 2004;99:2393-404
31. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Paolino E, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR. Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2006;12:2-12
32. Favier B, LeMaoult J, Carosella ED. Functions of HLA-G in the immune system. *Tissue Antigens*. 2007;69:150-2
33. Favier B, LeMaoult J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update. *Tissue Antigens*. 2007;69:207-11
34. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, Nimmo ER, Massey D, Berzuini C, Johnson C, Barrett JC, Cummings FR, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson CE, Blaszczuk K, Inouye M, Ewels P, Ravindrarajah R, Keniry A, Hunt S, Carter M, Watkins N, Ouwehand W, Lewis CM, Cardon L, Lobo A, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Mansfield JC, Deloukas P, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. Genetics determinants of ulcerative colitis include the ECMI locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;49:710-712
35. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle

- WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet.* 2008;40:1319-1323
36. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003;52:65-70
37. Fuss IJ, Strober W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 2008;1:S31-S33
38. George FL, Thompson WG, Chey W, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 2006;130:1480-1491
39. Gerseemann M, Whkamp J, Fellermann, Stange EF. Crohn's disease – defect in innate defence. *World J Gastroenterol.* 2008;14:5499-5503
40. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology.* 2001;121:1320-1328
41. Glocker E, Grimbacher B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:41-48
42. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Eng J Med.* 2009;361:2033-2045

43. Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P, van Eden W, Versalovic J, Weinstock JV, Rook GA.. Mechanism of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:275-84
44. Gutkowski K, Gutkowska D. Rola mechanizmów immunologicznych w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit. *Gastroenterol Pol*. 2006;13:197-201
45. Halfvarson J, Jess T, Bodin L, Jarnerot G, Munkholm P, Binder V, Tysk C. Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;12:1536-44
46. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3668-72
47. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of non-synonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn's disease in ARG16L1. *Nat Genet*. 2007;39:207-11
48. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key factor Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129:550-564
49. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet*. 2003;362:2012-5

50. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod.* 2006;12:209-232
51. Iwańczak B, Iwańczak F. Klasyfikacja rozległości i aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci i dorosłych. *Pediatrica Wsp, Gastroenterol, Hepatol Żywnienie Dziecka.* 2011;13:170-174
52. Jenkins D, Balsitis M, Galilivan , Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, Theodossi A, Williams GT. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology initiative. *J Clin Pathol.* 1997;50:93-105
53. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto , Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn's disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 2008;118:2269-80
54. Khosretrani K, Le danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S. HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:750-2
55. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121:1-14
56. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:211-22
57. Lafon M, Prehaud C, Megret F, Lafage M, Mouillot G, Roa M, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J Virol.* 2005;79:15226-15237

58. Latinne D, Fiasse R. New insights into cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg.* 2006;69:393-405
59. Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176:3266-3276
60. LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond S, Gonzalez A, Carosella ED. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood.* 2007;109:2040-2048
61. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:767-77
62. Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Fabiani JN, Carpentier A. Soluble human leukocyte antigen-G: a new strategy for monitoring acute and chronic rejections after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26:421-422
63. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimm Rev.* 2010;9:372-378
64. Lozano JM, González R, Kindelán JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, Carosella ED, Peña J. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS.* 2002;16:347-351
65. Luque J, Marín J, García-Jurado G, González R, Pascual D, Guerra N, López-Rubio F, Alvarez-López MR, Arizón JM, Peña J. Soluble HLA-G in heart

- transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunology*. 2006;67:257-263
66. Manganelli C, Turco S, Beleztrazzi E. Ophthalmological aspects of IBD. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2009;13:11-3
67. Marks D, Rahman FZ, Swel G, Segal AW. Crohn's Disease: an immune deficiency state. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2010;38:20-31
68. Mayer L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J Gastroenterol*. 2010;45:9-16
69. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, Zody MC, Hall JL, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Silverberg MS, Taylor KD, Rioux JD, Altshuler D, Daly MJ, Xavier RJ. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40:1107-12.
70. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97
71. Megret F, Prehaud C, Lafage M, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Lafon M. Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Hum Immunol*. 2007;68:294-302
72. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Monocyte-derived HLA-G acts as strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon- β in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005;159:155-164

73. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 201;108:601-609
74. Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-23 and TH17 Cells in the Control of Gut Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2009;2009:297645
75. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008;226:205-218
76. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut.* 2011;60:571-607
77. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M, Caumartin J, LeMaout J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood.* 2007;110:3936-3948
78. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res.* 2007;149:173-186
79. Okazawa A, Kanai T, Nakamaru K, Sato T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Ikeda M, Kawamura T, Makita S, Uraushihara K, Okamoto R, Yamazaki M, Kurimoto M, Ishii H, Watanabe M, Hibi T. Human intestinal epithelial cell-derived interleukin IL-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:269-276

80. Onno M, Pangault C, Le Friec G, Guilloux V, André P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2000;164:6426-6434
81. Petrie A, Sabin C. Statystyka medyczna w zarysie. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2006
82. Pinsk V, Lemberg DA, Grewal K, Barker CC, Schreiber RA, Jacobson K. Inflammatory bowel disease in South Asian pediatric population of British Columbia. *Am J Gastroenterology.* 2007;102:1077-83
83. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol.* 2007;17:469-479
84. Polńska B, Matowicka-Karna J, Kemon H. Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. *Postępy Hig Med Dosw.* 2009;63:389-394
85. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant.* 2006;6:2152-2156
86. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006;4:e9
87. Rebmann V, Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Gross-Wilde H. Report of the wet workshop for quantification of soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol.* 2005;66:853-63
88. Rizzo R, Mapp CE, Melchiorri L, Maestrelli P, Visentin A, Ferretti S, Bononi I, Miotto D, Baricordi OR. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:508-513

89. Rizzo R, Melchiorri L, Simone L, Stignani M, Marzola A, Gullini S, Baricordi OR. Different production of soluble HLA-G antigens by peripheral blood mononuclear cells in ulcerative colitis and Crohns disease: a noninvasive diagnostic tool? *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:100-105
90. Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Human Immunol.* 2007;68:244-250
91. Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1277-83
92. Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:11520-11525
93. Rouas-Freiss N, LeMaoult J, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant.* 2003;3:11-16
94. Sailer J, Peloschek P, Schober E, Schima W, Reinisch W, Vogelsang H, Wunderbaldinger P, Turetschek K. Diagnostic value of CT enteroclysis compared with conventional enteroclysis in patients with Crohn's disease. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;185:1575-81
95. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4280-4288
96. Sarra M, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1808-1813

97. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis.* 2010;11:266-276
98. Schwartz DA. What is the optimal maintenance treatment for perianal Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Oct;14 (Suppl 2):S269-70
99. Scott SA. Management of acute colitis and toxic megacolon. *Clin Colon Rectal Surg.* 2010;23:274-84
100. Sewell GW, Marks D, Segal AW. The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model. *Current Opinion in Immunology.* 2009;21:506-513
101. Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25:301-305
102. Shen W, Durum SK. Synergy of IL-23 and TH17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. *Neurochem Res.* 2010;35:940-946
103. Shih DQ, Targan SR. Insights into IBD pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2009;11:473-480
104. Siew CN, Kamm MA. Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:935-949
105. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut.* 2008;57:903-10
106. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJ, Sewell GW, Palmer CD, Wilde J, Foxwell BM, Gloger IS, Sweeting T, Marsh M, Walker AP, Bloom SL, Segal AW. Disordered macrophage cytokine secretion underlies

- impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med.* 2009;206:1883-97
107. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut.* 2006;55:i16-35
 108. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Fléjou JF, Herfarth H, Hommes DW, Kupcinkas L, Lakatos PL, Mantzaris GJ, Schreiber S, Villanacci V, Warren BF. European evidence-based consensus on diagnostic and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2008;2:1-23
 109. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007;117:514-21
 110. Stucchi A, Reed K, O'Brien M, Cerda S, Andrews C, Gower A, Bushell K, Amar S, Leeman S, Becker J. A new transcription factor that regulates TNF-alpha gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with CD and UC. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:581-587
 111. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117:1137-46
 112. Szczeklik K, Owczarek D, Pytko-Polończyk J, Kęsek B, Mach T. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122(5):200-208
 113. Tabayoyong WB, Zavazava N. Soluble HLA-G revisited. *Leuk Res.* 2007;31:121-125

114. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:831-848
115. Torres MI, LeDiscorde M, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Gil A, Maldonado J, Dausset J, Carosella ED. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohns disease. *Internat Immunol.* 2004;16:579-583
116. Torres MI, Lopez-Casado MA, Luque J, Peña J, Ríos A. New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G. *Int Immunol.* 2006;18:713-718
117. Torres MI, Lopez-Casado MA, Rios A. New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1156-1161
118. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol.* 2006;169:1901-9
119. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology.* 2011;140:1807-16
120. Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer- different stories with the same message. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:337-42
121. Urosevic M, Dummer R. Human leukocyte antigen G and cancer immunoediting. *Cancer res.* 2008;68:627-630
122. Urosevic M. HLA-G in the skin – friend or foe? *Sem Cancer Biol.* 2007;17:480-484
123. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinskis L, Mantzaris G, Travis S, Stange E. The second European evidence-based Consensus on the

- diagnosis and management of crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010;4:7-27
124. Vavricka SR, Rogler G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med WKLY*. 2009;129:527-534
 125. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2006;67:561-567
 126. Watford WT, Hissong BD, Bream J, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev*. 2004;202:139-156
 127. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005;102:18128034
 128. White SR. Human leucocyte antigen-G:expression and function in Airways allergic disease. *Clinical et Experimental Allergy*. 2012;42:208-217
 129. Woźniak-Stolarska B, Sajewicz Z, Błachut K. Poziom IL-10 w surowicy krwi w zapalnych chorobach jelit. *Gastroenterol Pol*. 2002;9:94
 130. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116:1310-1316

131. Zelante A, Borgoni R, Galuppi C, Cifalà V, Melchiorri L, Gullini S, Baricordi O, Rizzo R. Therapy modifies HLA-G secretion differently in Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:95-5
132. Zwolińska-Wcisło M, Budak A, Trojanowska D, Mach T, Rudnicka-Sosin L, Galicka-Latała D, Nowak P, Cibor D. Wpływ kolonizacji grzybów *Candida* na przebieg wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Przegl Lek.* 2006;63(7):533-538
133. Zwolińska-Wcisło M, Ptak-Belowska A, Targosz A, Urbańczyk K, Rozpondek P, Galicka-Latała D, Mach T. Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na przebieg wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Przegl Lek.* 2009;66(9):503-507
134. Żabka A, Mazur B, Karczewska K. IL-10 and IL-13 serum concentrations in children with inflammatory bowel disease. *Pediatr Wsp Gastroenterol Hepatol Żywienie Dziecka.* 2007;9:105-107