



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Żywienia Człowieka
i Chorób Wewnętrznych

Pracownia Nutrigenetyki

**Ocena przydatności badań mutacji i polimorfizmów
wybranych genów do prognozowania przebiegu
choroby Leśniowskiego-Crohna**

mgr inż. Ludwika Jakubowska-Burek

Promotor: Prof. UM dr hab. Agnieszka Dobrowolska-Zachwieja

Praca doktorska

Praca uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej nr 1077/07



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Samorząd Województwa Wielkopolskiego
Wojewódzki Urząd Pracy
w Poznaniu

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



OŚWIADCZENIE DOKTORANTA
w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2, Priorytetu VIII, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

Oświadczam, że jestem stypendystą w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

I declare that I am a scholarship holder within the project “Scholarship support for PH.D. students specializing in majors strategic for Wielkopolska’s development”, Sub-measure 8.2.2 Human Capital Operational Programme, co-financed by European Union under the European Social Fund.

Oświadczam, że jestem także słuchaczką Studium Medycyny Molekularnej, ul. Żwirki i Wigury 61, pokój 623, 02-091 Warszawa, tel/fax (22) 57 20 558 w ramach IX Kursu rekrutowanego w 2006 roku.

PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania wszystkim, dzięki którym realizowanie badań wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej było nie tylko możliwe, ale także było przyjemnością i spełnieniem moich zawodowych marzeń i planów.

Szanownemu Panu Profesorowi dr hab. Ryszardowi Słomskiemu dziękuję za nieocenioną pomoc, umożliwienie wykonania badań w laboratoriach IGCzPAN oraz Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a przede wszystkim za życzliwość i merytoryczne wsparcie, na które zawsze mogłam liczyć.

Dziękuję pracownikom Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, szczególnie Zakładowi Funkcji Kwasów Nukleinowych, za pomoc w realizacji badań, a zwłaszcza Paniom Marcie Kaczmarek – Ryś i Justynie Hoppe – Gołębiewskiej za wieloletnią współpracę i nauczanie mnie laboratoryjnego warsztatu.

Panu Profesorowi dr hab. med. Krzysztofowi Linke dziękuję za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Przede wszystkim dziękuję jednak mojemu Promotorowi, Pani Profesor UM dr hab. med. Agnieszce Dobrowolskiej-Zachwiei, bez pomocy której ta praca nigdy by nie powstała. Życzliwość, wsparcie i zaufanie, którym mnie obdarzyła będę zawsze pamiętać i będą dla mnie zawsze wzorem Idealnego Szefa. Miałam w życiu ogromne szczęście, że mogłam realizować się zawodowo pod okiem tak wspaniałego specjalisty, jakim jest Pani Profesor, ale przede wszystkim, że mogłam współpracować z takim Człowiekiem. Realizując swoje zawodowe zainteresowania wierzyłam zawsze, że mam przy boku prawdziwego Przyjaciela.

Dziękuję też tym wszystkim, których nie wymieniłam tu z imienia i nazwiska, a którzy byli mi życzliwi i pomocni: zespołowi lekarskiemu, personelowi szpitalnemu, oraz wielu innym osobom, z którymi miałam okazję współpracować, a które zawsze będę ciepło wspominać.

Pragnę też podziękować mojej Rodzinie: Dziadkom, Rodzicom, Siostrze oraz mojemu Mężowi, za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam. Bez nich nie osiągnęłabym tego wszystkiego.

Bardzo serdecznie dziękuję.

Ludwika Jakubowska-Burek

1. Wstęp	3
2. Streszczenie.....	4
3. Summary	6
4. Nieswoiste choroby zapalne jelit	8
4.1. Rys historyczny	8
4.2. Ogólna charakterystyka nieswoistych chorób zapalnych jelit	9
4.2.a. Podział na chorobę Leśniowskiego – Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego	9
4.2.b. Wiek zachorowania	14
4.2.c. Różnice populacyjne	15
4.3. Czynniki środowiskowe w nieswoistych chorobach zapalnych jelit	16
4.3.a. Palenie	17
4.3.b. Dieta; nutrigenetyka jako nowa opcja terapeutyczna w leczeniu NChZJ	17
4.4. Czynniki genetyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit	23
4.4.a. Rodzinne występowanie nieswoistych chorób zapalnych jelit	23
4.4.b. Nieswoiste choroby zapalne jelit u bliźniąt mono- i dizygotycznych	23
4.4.c. Podłoże genetyczne nieswoistych chorób zapalnych jelit	24
4.4.c.1. Gen <i>CARD15/NOD2</i> i białko NOD2	27
4.4.c.2. Gen i białko <i>DLG5</i>	30
4.4.c.3. Gen i białko <i>ATG16L1</i>	32
4.4.c.4. Gen i białko <i>IL23R</i>	33
4.4.c.5. Gen i białko <i>OCTN1</i>	35
4.4.c.6. Gen i białko <i>TNFalfa</i>	37
4.4.d. Polimorficzność jako cecha występująca naturalnie w populacji – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP)	39
4.4.e. Poradnictwo genetyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit	39
5. Metodyka	41
5.1. Charakterystyka grupy badanej	41
5.2. Molekularne metody badawcze	42
5.2.a. Izolacja wysokocząsteczkowego DNA z krwi – metoda z GTC	43
5.2.b. Amplifikacja DNA przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (<i>PCR –ang. polymerase chain reaction</i>)	45
5.2.b.1. Ustalanie warunków reakcji	45
5.2.b.2. Projektowanie starterów	47
5.2.b.3. Analiza produktów reakcji PCR przy zastosowaniu elektroforezy poziomej w żelach agarozowych	50
5.2.b.4. Sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym – pirosekwencjonowanie	50
5.3. Objawy kliniczne	54
5.3.a. Lokalizacja objawów z przewodu pokarmowego	54

5.3.b. Lokalizacja objawów występujących poza układem pokarmowym	55
6. Cel pracy i założenia	57
7. Wyniki	58
7.1. Analiza rozkładu genotypów i alleli	58
7.2. Analiza związku poszczególnych genotypów z lokalizacją objawów z obszaru przewodu pokarmowego	60
7.3. Analiza związku poszczególnych alleli z lokalizacją objawów z obszaru przewodu pokarmowego	64
7.4. Analiza związku genotypów z objawami spoza przewodu pokarmowego	67
7.5. Analiza związku alleli z objawami spoza przewodu pokarmowego	74
7.6. Analiza związku genotypów i alleli z leczeniem	75
7.7. Analiza związku genotypów ze współistniejącymi w rodzinie chorobami	77
8. Wnioski	78
9. Dyskusja	82
10. Wykaz skrótów używanych w pracy	90
11. Wykaz odczynników, enzymów, markerów oraz buforów używanych w analizach	91
12. Spis tabel	93
13. Spis rycin	97
14. Bibliografia	99

1. WSTĘP

Choroba Leśniowskiego – Crohna (ChLC), obok wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG), należy do nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ). Charakteryzuje ją stan zapalny ścian przewodu pokarmowego z owrzodzeniami, ropniami (15-20% przypadków) oraz przetokami międzypętlowymi lub jelitowo-skórnymi (20-40%). Objawami występującymi u pacjentów dotkniętych tą chorobą są: krwawienie z przewodu pokarmowego, utrata masy ciała, biegunka, bóle brzucha, a także zmiany okołoodbytnicze i niedrożność. Przedstawienie tylko niektórych objawów klinicznych typowych dla ChLC daje pojęcie o uciążliwości przebiegu tego schorzenia. Sytuacja wygląda znacznie poważniej, kiedy mamy do czynienia z pacjentami pediatrycznymi. Stanowią oni niewielką grupę spośród wszystkich chorujących – około 10-15% - ale to właśnie u nich przebieg choroby jest najbardziej dramatyczny. Złe wchłanianie składników pokarmowych w przebiegu choroby prowadzi bardzo często do stanów skrajnego niedożywienia a w konsekwencji do niedorozwoju fizycznego i wycieńczenia organizmu. Ustalenie zależności między występowaniem określonych objawów klinicznych a posiadany genotypem dałoby możliwość wczesnej diagnostyki i prewencji zanim jeszcze choroba się rozwinie. Często zdarza się, że pacjenci trafiający na oddział szpitalny mają już bardzo zaawansowane stadium choroby. Gdyby można było za pomocą prostych badań genetycznych przewidzieć rozwój choroby, to, jaki zajmie ona odcinek przewodu pokarmowego lub gdyby badania te umożliwiłyby określenie ryzyka wystąpienia choroby u dzieci osób nią dotkniętych, leczenie można by rozpocząć nie tylko dużo wcześniej, ale także mogłoby ono być efektywniejsze i mniej kosztowne. Być może wyniki otrzymane w ramach badań przeprowadzonych na potrzeby tej pracy doktorskiej pozwolą rozwinąć diagnostykę a także profilaktykę choroby Leśniowskiego - Crohna.

Niniejsza praca doktorska została zaopatrzona w część wstępną, mającą na celu wprowadzenie w specyfikę ChLC. Nie jest ona przeglądem całej literatury, jaka w danym temacie została opublikowana. Stanowi raczej próbę wybrania i przeglądowego pokazania licznych aspektów choroby, począwszy od obrazu klinicznego choroby, występowania, różnic epidemiologicznych, a skończywszy na uwarunkowaniu genetycznym i środowiskowym. Celem niniejszego wstępu jest

raczej ukazanie dlaczego zdecydowano się na przeprowadzenie badań genetycznych, pokazanie szerokiego spektrum problemów z jakimi muszą borykać się pacjenci i ewentualnych sposobów rozwiązania tego poważnego problemu.

2. STRESZCZENIE

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC), obok wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG), należy do nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ). W ChLC najczęściej obserwuje się takie objawy kliniczne jak: biegunka, bóle brzucha i spadek masy ciała. Zdarzają się także krwawienia, zmiany okołoodbytnicze, przetoki wewnętrzne i zewnętrzne, niedrożność jelit. Występuje też szereg objawów, które nie są związane z przewodem pokarmowym, np.: zapalenie stawów, choroby wątroby i dróg żółciowych, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, kamica żółciowa, choroby oczu (np.: zapalenie tęczówki lub spojówki, nieostre widzenie, fotofobia) oraz skóry (np. rumień guzowaty). ChLC – podobnie jak WZJG – przebiega w postaci nawrotów i remisji. Pomimo tego, iż choroba znana jest od wielu dziesięcioleci, nadal zagadką pozostaje jej etiologia. Wiadomo natomiast, że ChLC jest chorobą wieloczynnikową i wielogenową.

Celem niniejszej pracy była analiza typu *multilocus*, czyli określenie 10 genotypów w grupie 160 pacjentów ze zdiagnozowaną ChLC (*DLG5 R30Q*, *OCTN1 1672 C/T*, *CARD15/NOD2 G908R*, *ATG16L1 rs2241879*, *ATG16L1 rs2241880*, *IL23R rs7517847*, *IL23R rs1004819*, *TNFalfa (-857C/T)*, *TNFalfa (420C/T)*, *TNFalfa (720A/T)*). Wyniki zostały odniesione do grupy porównawczej. Starano się także określić ewentualny związek genotypów lub alleli z konkretnymi symptomami chorobowymi zarówno z obszaru przewodu pokarmowego, jak i spoza niego.

Zastosowano analizę genetyczną DNA pacjentów wyizolowanego z leukocytów krwi obwodowej, a następnie przy użyciu metody PCR (ang. polymerase chain reaction), metod elektroforetycznych oraz pirosekwencjonowania (czyli sekwencjonowania w czasie rzeczywistym) określono genotyp każdego pacjenta i osób z grupy populacyjnej. Następnie zbadano zależności pomiędzy konkretnym genotypem a obrazem klinicznym choroby. Wszystkie dane zostały także poddane analizie statystycznej.

Otrzymane wyniki wskazywały na brak wyraźnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w grupie pacjentów i populacyjnej. Analiza alleli wykazała jednak, że dla genu *ATG16L1* (rs2241880) allel C był istotnie częstszy w grupie chorych ($p=0.0017$, dla allelu T $p=0.0775$), natomiast dla genu *IL23R* (rs7517847) allel T był istotnie częstszy w grupie chorych ($p=0.0011$, dla allelu G $p=0.0987$). Wskazuje to, że allele C (dla *ATG16L1* Thr300Ala(rs2241880) oraz T dla genu *IL23R* rs7517847) mogą wiązać się z podwyższonym ryzykiem zachorowania na ChLC.

Udało się także zaobserwować pewne tendencje odnośnie związku z lokalizacją objawów chorobowych a genomem pacjentów. Zaobserwowano związek z manifestacją jelitową objawów chorobowych a genami *DLG5*, *OCTN1*, *CARD15/NOD2*, *ATG16L1* oraz *IL23R*.

Jedynym genem, który w wyniku niniejszej analizy wykazywał związek z leczeniem był gen *ATG16L1*. W zakresie obu badanych polimorfizmów (rs 2241879 oraz rs2241880) wykazano, że uzyskany układ genotypów nie jest przypadkowy i ma istotny statystycznie związek z leczeniem metylprednizolonem pacjentów z ChLC.

Pomimo, iż dowiedziono pewnych zależności genetycznych, nie mogą one jednak stanowić jedynej podstawy diagnostycznej. Powinny one być raczej traktowane jako swoista predyspozycja do ewentualnego rozwoju choroby u pacjenta. Nadal jednak podstawowym źródłem stawianej diagnozy pozostaje badanie przedmiotowe, podmiotowe oraz badania kolonoskopowe, histopatologiczne oraz badania obrazowe.

Warto jednak zaznaczyć, że chociaż nadal nie poznano istotnych zależności genetycznych leżących u podłoża ChLC, nie oznacza to, że nie jest to możliwe w przyszłości. Na świecie trwają analizy zmierzające do ustalenia przyczyn choroby i wydaje się, że w miarę możliwości polscy badacze będą próbowali odnaleźć się w tym nurcie. Choroba Leśniowskiego-Crohna jest przecież chorobą bardzo złożoną, a niniejszy projekt badawczy pokrywa tylko pewną część hipotez.

3. SUMMARY

Crohn's disease (CD), similar to ulcerative colitis (UC), is one of the non-specific inflammatory bowel diseases. The most frequent clinical symptoms observed in CD include: diarrhea, abdominal pain and weight loss. Also observed are bleeding, peri-rectal changes, external and internal fistulas and bowel obstruction. Several symptoms not directly related to the alimentary tract may be present, such as, arthritis, liver and bile tract diseases, primary sclerosing cholangitis, bile stones, eye diseases (e.g., iritis or conjunctivitis, decreased visual acuity, photophobia) and skin diseases (e.g., erythema nodosum). CD, similar to UC, is a relapsing and remitting disease. Although the condition has been recognized for decades, its etiology remains unknown. It is known, however, that CD is a multifactorial and polygenic disease.

The goal of this dissertation was to conduct a multilocus analysis, that is, to describe 10 genotypes in a group of 160 patients with confirmed CD (*DLG5* R30Q, *OCTN1* 1672 C/T, *CARD15/NOD2* G908R, *ATG16L1* rs2241879, *ATG16L1* rs2241880, *IL23R* rs7517847, *IL23R* rs1004819, *TNFA* (-857C/T), *TNFA* (420C/T). The results were compared to healthy controls. The study also attempted to assess the possible relationship between genotypes or allele and specific alimentary tract or extra-alimentary tract clinical symptoms.

The study involved a genetic analysis in which the patients' DNA was isolated from peripheral leucocytes. Then, individual genotypes and the genotypes of the healthy control group were determined using PCR (polymerase chain reaction), electrophoresis and real-time sequencing, . Next, the relationship between specific genotypes and clinical characteristics of the disease was examined using statistical analysis.

Our results indicated a lack of specific genotypic differences between the patient and the healthy control groups. The analysis of alleles showed that for the *ATG16L1* (rs2241880) gene the allele C occurred more frequently in the diseased population ($p=0.0017$; $p=0.0775$ for allele T), while for *IL23R* (rs7517847) gene allele T occurred, in fact, more frequently in the diseased group ($p=0.0011$, $p=0.0987$ for allele G). These results indicate that allele C (for *ATG16L1* Thr300Ala(rs2241880)

and allele T for the gene *IL23R* rs7517847) may be associated with an increased risk for CD.

We also observed certain tendencies between the symptom distribution and the genome. We observed a relationship between genes *DLG5*, *OCTN1*, *CARD15/NOD2*, *ATG16L1* and *IL23R* and the presence of alimentary tract symptoms.

Despite the fact that we have shown certain genetic relationships, these relationships cannot be used for diagnostic purposes. Currently, the diagnosis is made on the basis of the clinical examination, colonoscopy, tissue pathology and imaging.

It is important to note that although the genetic basis of CD is currently unknown, it does not mean that it will not be identified in the future. All around the world research to identify the etiology of the disease is ongoing, and Polish researchers are attempting to be a part of this effort. CD is a complex disease, and the current project examines only a few plausible hypotheses regarding the etiology of the disease.

4. NIESWOISTE CHOROBY ZAPALNE JELIT

4.1. RYS HISTORYCZNY

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to termin odnoszący się do przewlekłych schorzeń przewodu pokarmowego o nadal nieznannej etiologii. NChZJ dzieli się na dwie jednostki chorobowe: chorobę Leśniowskiego – Crohna (ChLC) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG). Choroba Leśniowskiego-Crohna została pierwszy raz scharakteryzowana przez polskiego chirurga, profesora Antoniego Leśniowskiego w 1904 roku. Pełen opis choroby zawdzięczamy jednak zespołowi badawczemu, w skład którego wchodził Crohn, Ginzburg i Oppenheimer. Wyodrębnili oni w 1932 roku ChLC jako osobną jednostkę kliniczną. Do dziś choroba ta nazywana jest na całym świecie chorobą Crohna, a w Polsce – chorobą Leśniowskiego – Crohna.

Początki badań nad genetycznym uwarunkowaniem NChZJ, w tym ChLC można datować na 1994 rok, kiedy to Yang i Rotter (Yang i Rotter, 1994) pierwszy raz opisali zwiększone występowanie NChZJ w rodzinach. Kolejne doniesienia (Duerr, 1996) potwierdziły, że posiadanie w rodzinie osoby chorującej na NChZJ zwiększa ryzyko wystąpienia choroby. Dane jednoznacznie wskazywały jednak na to, że ryzyko to jest zdecydowanie większe dla ChLC niż dla WZJG.

Kolejny przełom stanowiły badania z 1996 roku, prowadzone przez Hugota (Hugot et al, 1996) które zlokalizowały region IBD1 na chromosomie 16. Od tego momentu rozpoczął się swoisty wyścig zmierzający do określenia konkretnego genu odpowiedzialnego za chorobę. Zakończyły go sukcesem dwa laboratoria badawcze, kierowane przez Ogurę i Hugota (Ogura i wsp., 2001, Hugot i wsp., 2001), lokalizujące gen *CARD15/NOD2* w locus 16q12. Udało się także zidentyfikować trzy główne mutacje w obrębie tego genu zwiększające znacznie ryzyko zachorowania: dwie mutacje punktowe G908R, R702W, oraz mutację typu insercyjnego polegającą na obecności dodatkowej cytozyny w pozycji 3020. Gen *CARD15/NOD2* zostanie omówiony szczegółowo w osobnym rozdziale.

Do momentu złożenia niniejszej pracy doktorskiej poznano 28 regionów w genomie człowieka, w których zlokalizowane są geny podatności na zachorowanie. Badania w zakresie genetycznego podłoża NChZJ prowadzone są jednak bardzo pręźnie i należy spodziewać się, że w najbliższych latach obecny stan wiedzy zostanie znacznie poszerzony.

4.2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA NIESWOISTYCH CHOROÓB ZAPALNYCH JELIT

4.2.a. PODZIAŁ NA CHOROBE LEŚNIEWSKIEGO - CROHNA I WRZODZIEJĄCE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) dzieli się na dwie podjednostki chorobowe: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) oraz na chorobę Leśniowskiego – Crohna (ChLC). Istnieje jednak grupa pacjentów (około 10-15%), których ze względu na niejednoznaczność objawów nie można zakwalifikować do żadnej z powyższych grup; tworzą oni odrębną kategorię zwaną *indeterminate colitis*. Zazwyczaj jednak szereg objawów klinicznych pozwala na rozróżnienie ChLC od WZJG. Obraz kliniczny choroby jest dość zróżnicowany. W WZJG proces zapalny obejmuje zazwyczaj błonę śluzową i podśluzową jelita grubego, natomiast w ChLC obejmuje wszystkie warstwy ścian jelita i może występować na całej jego długości: począwszy od jamy ustnej a skończywszy na odbycie. Najczęściej jednak ChLC zajmuje jelito cienkie i kątnicę (40% pacjentów), wyłącznie jelito cienkie (30%) oraz wyłącznie jelito grube (25%) (Yamada 2006).

U pacjentów chorujących na WZJG najczęściej obserwowanym objawem jest biegunka, często krwista. Stolce oddawane są dość często, co spowodowane jest zmianami chorobowymi odbytnicy. Ponieważ wypróżnienia są liczne, często charakteryzuje je mała objętość. Biegunkom towarzyszy zazwyczaj ból brzucha, nierzadko połączony z utratą masy ciała, gorączką i ogólnym osłabieniem organizmu. Około 30% pacjentów ma formę choroby o średniej aktywności, ale 20% chorych charakteryzuje ciężki przebieg choroby, któremu towarzyszyć mogą nawet takie

objawy jak: tachykardia, hipotonia, znaczna tkliwość w obrębie jamy brzusznej, niedokrwistość, oddawanie ponad 6 krwistych stolców na dobę czy toksyczne rozdęcie jelita grubego (Yamada 2006).

Zazwyczaj WZJG początkowo przebiega łagodnie, z nasileniem objawów w przeciągu kilku tygodni. Zdarza się jednak, że w sporadycznych przypadkach choroba zaczyna się w tempie piorunującym. U takich pacjentów, w związku z brakiem efektu leczenia zachowawczego, wdraża się zazwyczaj leczenie chirurgiczne już na początku choroby. Jednak w 90% przypadków po pierwszym rzucie choroby przechodzi ona w stan remisji, po którym ponownie dochodzi do zaostrzenia. W tym rytmie choroba może trwać nawet kilkanaście lat.

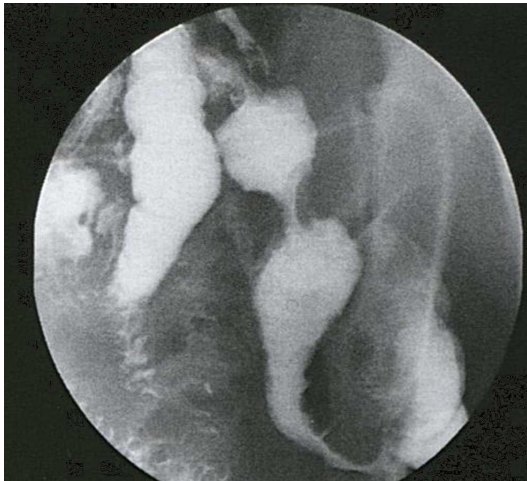
Drugą formą NChZJ jest choroba Leśniowskiego – Crohna. Obejmuje ona najczęściej jelito cienkie i kątnicę (40% przypadków), wyłącznie jelito cienkie (30%) oraz wyłącznie jelito grube (25%). W przypadkach, gdy zajęte jest wyłącznie jelito grube rozpoznaje się dwie formy choroby: pierwsza polega na zajęciu stanem chorobowym całej długości jelita grubego (*pancolitis*) – dotyczy ona dwóch trzecich przypadków; druga forma polega na występowaniu zmian odcinkowych – jedna trzecia zachorowań. Rzadziej zdarza się, aby choroba zajmowała górny odcinek przewodu pokarmowego.

Najczęściej obserwuje się takie objawy kliniczne jak: biegunka, bóle brzucha i spadek masy ciała. Zdarzają się także krwawienia, zmiany okołoodbytnicze, przetoki wewnętrzne i zewnętrzne, niedrożność jelit. Występuje też szereg objawów nie związanych z przewodem pokarmowym, np.: zapalenie stawów (także zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa - zwłaszcza w WZJG: 30 razy częściej niż w populacji ogólnej), choroby wątroby i dróg żółciowych, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (10-15% przypadków), kamica żółciowa, choroby oczu (np.: zapalenie tęczówki lub spojówki, nieostre widzenie, fotofobia) oraz skóry (np. rumień guzowaty).

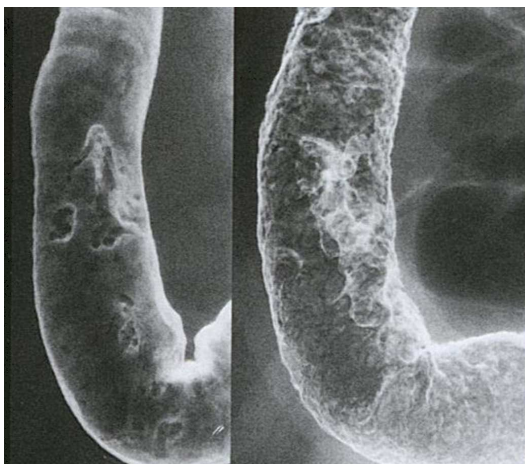
ChLC – podobnie jak WZJG – przebiega w postaci nawrotów i remisji. Okresy remisji mogą pojawiać się samoistnie – jak to ma miejsce u 30% chorych – i mogą trwać nawet 2 lata. Niestety, 60% chorych wymaga zabiegów chirurgicznych w

okresie 10 lat od postawienia diagnozy, a prawie 45% kolejnych interwencji chirurgicznych.

Obraz diagnostyczny NChZJ jest dość specyficzny i w większości przypadków (z wyjątkiem grupy *indeterminata*) pozwala na postawienie rozpoznania. I tak np. w badaniach radiologicznych choroby Leśniowskiego-Crohna obserwuje się charakterystyczne obrazy zwężeń jelita a nawet jego niedrożności (Rycina 1), podczas gdy w wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego widać wyraźnie tzw. „sztywną rurę” przewodu pokarmowego, która jest wynikiem długotrwałego stanu zapalnego powodującego usztywnienie ścian jelita (Rycina 2). Charakterystyczne dla obrazu choroby jest także jednoczesne występowanie tkanki zmienionej chorobowo w wyniku ciągłego stanu zapalnego na zmianę z tkanką zdrową (Rycina 3).



Rycina 1. Choroba Leśniowskiego-Crohna – obraz radiologiczny choroby: charakterystyczne zwężenia jelita, prowadzące do niedrożności. Źródło: <http://images.google.pl>



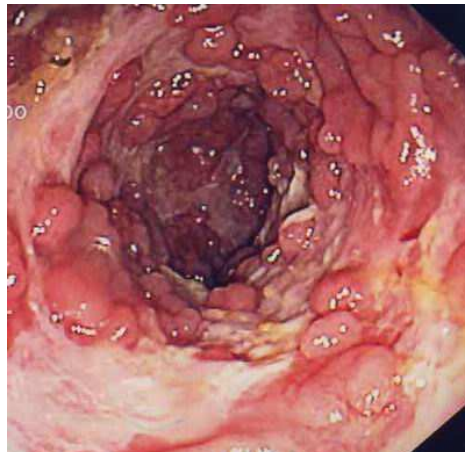
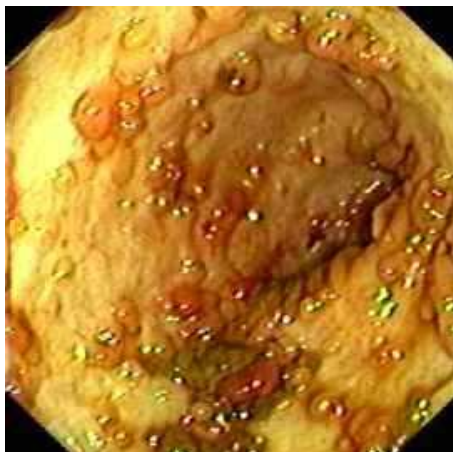
Rycina 2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego – obraz radiologiczny choroby: charakterystyczna tzw. „sztywna rura” przewodu pokarmowego, stan jelita po długotrwałym procesie zapalnym. Źródło: <http://images.google.pl>



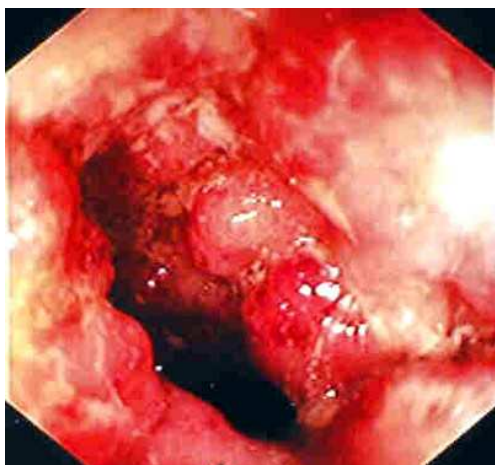
Rycina 3. Charakterystyczny obraz jelita w chorobie Leśniowskiego – Crohna: zdrowa tkanka poprzeplatana jest tkanką zmienioną chorobowo (po resekcji). Źródło: <http://images.google.pl>

Diagnozę NChZJ opiera się m.in. na obrazie histopatologicznym choroby. Dla ChLC charakterystyczne jest występowanie zmian chorobowych obejmujących wszystkie warstwy ścian jelita. Cechą typową dla choroby jest występowanie głębokich szczelin, dających niekiedy obraz charakterystycznej kostki brukowej. Diagnozę umożliwia także obecność guzków sarkoidalnych (obecnych również w innych chorobach, takich jak sarkoidoza czy gruźlica, stąd konieczność badań różnicowych), które często zlokalizowane są w bliskiej lokalizacji naczyń krwionośnych. We WZJG natomiast owrzodzenie jest płaskie i dotyczy tylko błony śluzowej i podśluzowej. Obserwuje się także ropnie krypt, które mogą też czasami pojawić się w przebiegu ChLC. Podstawową różnicą jest jednak lokalizacja zmian zapalnych: w ChLC zmiany pojawiają się odcinkowo i mogą dotyczyć całej rury przewodu pokarmowego, podczas gdy w WZJG choroba lokalizuje się tylko w rejonie okrężnicy.

Dla nieswoistych chorób zapalnych jelit charakterystyczny jest także obraz endoskopowy choroby. Poniżej przedstawione zostały przykładowe zdjęcia światła jelita w WZJG (Rycina 4) oraz ChLC (Rycina 5). Widać wyraźnie zmienioną zapalnie śluzówkę jelita, ropnie, zaczerwienienia oraz krwawe wybroczyny. Cechą różniącą ChLC od WZJG jest objęcie przez proces zapalny nie tylko błony śluzowej, ale całej grubości jego ściany jelita (od błony śluzowej do błony surowiczej).



Rycina 4. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Źródło: <http://images.google.pl>.



Rycina 5. Choroba Leśniowskiego-Crohna. Źródło: <http://images.google.pl>.

Zarówno WZJG jak i ChLC różnią się między sobą zarówno w aspekcie epidemiologii (Tabela 1), jak i obrazu klinicznego choroby. Nieswoiste choroby zapalne jelit występują np. częściej u rasy białej niż u rasy czarnej i Azjatów. Co więcej, w ostatnich latach obserwuje się około 5-krotny wzrost częstości zachorowań na ChLC w stosunku do WZJG (Okabe, 2001). Ciekawym zjawiskiem jest także zapadalność na tą chorobę w populacji żydowskiej, zwłaszcza wśród Żydów Aszkenazyjskich – tutaj pojawia się ona kilkakrotnie razy częściej niż w innych grupach populacyjnych.

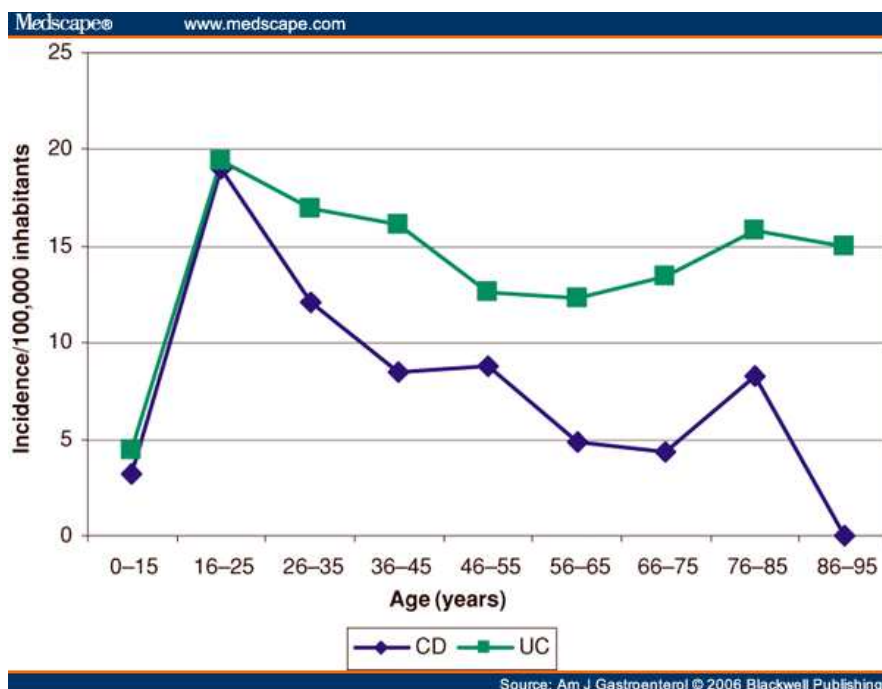
Tabela 1 Częstość występowania i epidemiologia NChZJ wg źródła: habilitacja Prof. UM dr hab. Agnieszka Dobrowolska-Zachwieja / w USA (na 100 000 osób) wg Yamada, 2006.

	WZJG	ChLC
Częstość występowania	6-8/2-10	2/1-6
Zachorowalność	70-150/35-100	20-40/10-100

Ciekawą cechą charakterystyczną dla NChZJ jest występowanie objawów spoza przewodu pokarmowego towarzyszących objawom gastroenterologicznym. Pacjenci bardzo często uskarżają się na bóle oczu, pieczenie pod powiekami, uczucie „piasku” w oku oraz zapalenie spojówek. Inne objawy dotyczą stawów; pacjenci cierpią z powodu bólu stawów łokciowych i kolanowych oraz skokowych i nadgarstkowych. Inną grupę dolegliwości stanowią zmiany skórne; zaliczamy do nich wysypki, świąd skóry oraz rumień guzowaty. Powyżej opisane objawy nie są czynnikiem determinującym rozpoznanie, nie muszą one bowiem występować w każdym przypadku, ale dotyczą one dużą grupę pacjentów i często są dodatkowym czynnikiem pogarszającym jakość ich życia. Ponadto, u chorych mogą występować: gorączka, spadek masy ciała, męczliwość, zahamowanie wzrostu (zwłaszcza u dzieci), wyniszczenie organizmu spowodowane niedożywieniem oraz ogólne osłabienie.

4.2.b. WIEK ZACHOROWANIA

Choroba Leśniowskiego Crohna to choroba tzw. „młodych dorosłych”. Pierwsze objawy pojawiają się zazwyczaj między 15 a 25. rokiem życia. Drugi okres zwiększonej zachorowalności przypada na okres około 50 roku życia. Zdarzają się jednak – choć rzadko – przypadki zachorowań w podeszłym wieku (Rysunek 6). Z tego też powodu niemożliwe jest stworzenie grupy kontrolnej dla badań a wszystkie otrzymane rezultaty zostały odniesione do grupy populacyjnej.



Rycina 6. Wiek rozpoznania NChZJ /100,000 osób. Źródło: Am J Gastroenterol, 2006, Blackwell Publishing /www.medscape.com/

Pokaźną grupę pacjentów odwiedzających kliniki gastroenterologiczne stanowią także dzieci (około 10-15% wszystkich pacjentów z rozpoznaną ChLC). U nich przebieg choroby jest zazwyczaj cięższy – choroba dzieci przed lub w trakcie okresu rozwojowego przyczynia się znacząco do zaburzeń procesów rozwojowych. Przewlekłe zapalenie śluzówki przewodu pokarmowego upośledza wchłanianie pokarmów a tym samym nie pozwala na wystarczające zaopatrzenie młodego, rozwijającego się organizmu w substancje budulcowe. Dzieci z ChLC są zazwyczaj drobniejszej budowy, nierzadko wyniszczone i niedostatecznie rozwinięte fizycznie a uboga dieta pogłębia często istniejące już niedobory.

Nie obserwuje się związku pomiędzy płcią a zachorowaniem na NChZJ.

4.2.c. RÓŻNICE POPULACYJNE

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) charakteryzuje ciekawe zjawisko różnej częstości występowania w zależności od tego, jaką badamy populację. W rozdziale 4.2.a. wspomniano już o pewnych podstawowych różnicach w zachorowalności na NChZJ, jak chociażby nasilenie ryzyka w populacji Żydów

Aszkenazyjskich, ale w niniejszym rozdziale problem zróżnicowanego występowania tej choroby w różnych grupach etnicznych zostanie omówiony obszerniej.

Pierwszym ciekawym zjawiskiem jest występowanie zasadniczej różnicy w zachorowaniach na NChZJ w zależności od stopnia uprzemysłowienia kraju i rozwoju społeczeństwa. Generalnie, w krajach gorzej rozwiniętych obserwuje się znacznie mniejszy odsetek chorujących na NChZJ. Np., w krajach Ameryki Północnej oraz w Europie odnotowuje się zdecydowanie większą ilość zachorowań niż w krajach azjatyckich. Obserwuje się także ciekawą zależność: w krajach, które przechodzą proces uprzemysłowienia i rozwoju obserwuje się wzrost zachorowań na WZJG, który z biegiem czasu przeradza się we wzrost zachorowań na ChLC (Cho, 2008). Widać więc, że komponenta wpływów środowiskowych jest w ChLC znacząca, ale jak dowiodły liczne badania, nie jest to jedyny typ różnic, jakie charakteryzują tą chorobę.

Kwestia zróżnicowanego występowania częstości zachorowań w zależności od populacji pozostaje nadal nieznaną, ale wiadomo już, że w różnych populacjach choroba może mieć różne podłoże genetyczne, różną częstość występowania poszczególnych polimorfizmów i mutacji, pomimo zbliżonego obrazu klinicznego.

Dlatego tak ważne jest, aby wyniki badań odnosić do określonej populacji, na której zostały one wykonane, ponieważ w innym wypadku przy tak zróżnicowanym podłożu choroby ustalenie jej przyczyn może okazać się niezwykle trudne.

4.3. CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE W NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT

Wiadomo, że NChZJ są warunkowane wieloczynnikowo: sugeruje się udział czynników środowiskowych (takich jak: palenie, dieta, zażywane leki, stres, wolne rodniki, itp.), które współdziałając z czynnikami genetycznymi oddziałują na układ immunologiczny powodując przewlekły stan zapalny śluzówki przewodu pokarmowego. Poniżej omówiono wybrane, najczęściej wymieniane czynniki środowiskowe biorące udział w w patogenezie choroby.

4.3.a. PALENIE

Palenie tytoniu jest jednym z najlepiej przebadanych czynników środowiskowych w odniesieniu do NChZJ. Jednakże, badania prowadzone zarówno na grupie pacjentów z WZJG, jak i tych z ChLC wykazały zasadnicze różnice.

Na przestrzeni ostatnich lat dowiedziono, że ryzyko zachorowania na WZJG wzrasta, jeżeli pacjent nie jest palaczem, lub jeśli palił ale niedawno nałóg porzucił. W odniesieniu do ChLC sprawa wygląda dokładnie odwrotnie – palenie wzmacnia ryzyko zachorowania, zwiększa ryzyko nowotworzenia oraz prawdopodobieństwo zabiegu operacyjnego (Russel, Wilson i Satsangi 2004). Udział nikotyny został także udowodniony w odniesieniu do przebiegu klinicznego choroby: pacjenci z ChLC, którzy byli czynnymi palaczami, ale w związku z chorobą przestali palić, przechodzili chorobę łagodniej (Karban, Eliakim i Brant, 2002, Cummings i Rubin 2006, Cho 2008). Natomiast odstawienie papierosów przez osoby z WZJG pogarszało ich stan zdrowia. Odnotowano nawet próby stosowania plastrów nikotynowych u pacjentów z WZJG celem złagodzenia przebiegu choroby, bez istotnego efektu leczniczego.

4.3.b. DIETA; NUTRIGENETYKA JAKO NOWA OPCJA TERAPEUTYCZNA W LECZENIU NCHZJ

Dieta to jeden z kluczowych czynników środowiskowych wpływających na NChZJ. Już od czasów Hipokratesa wiadomo, że żywienie i stosowana dieta mają znaczący wpływ na stan zdrowia człowieka. Nauki żywieniowe dostarczają informacji, które pozwalają na wykorzystanie składników pokarmowych w celu osiągnięcia optymalnego rozwoju organizmu. Mają one na celu zdefiniowanie błędów dietetycznych i taki dobór parametrów i wskazówek żywieniowych, aby zminimalizować ryzyko chorób spowodowanych nieprawidłową dietą, ale jednocześnie zwiększyć korzyści płynące z różnorodności dostępnych składników pokarmowych.

Warto zauważyć, że pierwsze doniesienia na temat leczenia chorób za pomocą restrykcji dietetycznych nie są nowością ostatnich lat, ale zostały określone

juz dawno i z powodzeniem stosuje się je do dziś w leczeniu chorób żywieniowych, np. fenyloketonurii czy galaktozemii.

Nie wszystkie choroby są jednak warunkowane w prosty, jednogenowy sposób. Istnieje szereg schorzeń, o których wiadomo, że są spowodowane w sposób bardziej złożony, jak np. nieswoiste choroby zapalne jelit, które są chorobą poligeniczną, co oznacza, że pojedyncza mutacja nie jest wystarczająca do ich zaistnienia, ale dopiero współdziałanie grupy genów objawia się chorobą. Szczegółowo wielogenowe podłoże NChZJ zostanie opisane w rozdziale 4.d.iii. pt: „Podłoże genetyczne NChZJ”.

Dieta, jako jeden z czynników środowiskowych, w połączeniu ze specyficznym wariantem genetycznym może okazać się ważnym elementem terapii pacjenta. Badania, które starają się połączyć aspekty genetyczne z żywieniowymi nazywane są nutrigenetyką i nutrigenomiką. Badają one wpływ bioreaktywnych komponentów żywności na organizm człowieka na poziomie komórkowym i tkankowym. Wg Davida Mutch (Mutch i wsp.2005) nutrigenomika skierowana jest na określenie wpływu składników pokarmowych na genom, identyfikację genów odpowiedzialnych za zwiększenie ryzyka chorób związanych z dietą oraz mechanizmów leżących u podłoża czynników regulujących predyspozycje do zachorowania na określone jednostki chorobowe. Nutrigenetyka bada efekt konkretnych wariantów genowych na interakcje między dietą, a zachorowaniem, w tym na rolę określonych polimorfizmów, oraz zapotrzebowanie badanego organizmu na składniki żywieniowe. Bada też ryzyko rozwoju określonych chorób u poszczególnych osobników. Nauki te mają na celu określenie w jaki sposób składniki odżywcze wpływają na genom oraz jak poszczególne geny wpływają na metabolizm składników żywieniowych. Ważny jest tu aspekt zróżnicowanej ekspresji genów (czyli m.in. produkcji poszczególnych białek w ludzkim organizmie) modyfikowanej poprzez dietę, jak również kwestia wpływu na metabolizm składników żywieniowych poszczególnych form polimorficznych danego genu. Mechanizmy te nie są jeszcze w pełni poznane, ale są już pierwsze badania, które udowadniają istnienie interakcji pomiędzy genami a składnikami żywieniowymi. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują np. na wpływ różnych grup wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na ekspresję cytokin i stan zapalny w organizmie, co może w przyszłości skutkować zmianami w leczeniu np. miażdżycy

(Anderle i wsp. 2004). Inne badania wskazują na możliwość modyfikacji białek histonowych przez składniki diety. Wiadomym jest, że struktura DNA uwarunkowana jest stopniem metylacji i ma wpływ na ekspresję genów. Biorąc pod uwagę możliwość dostarczania grup metylowych z pożywieniem widać wyraźnie, że dieta daje możliwości metylacji struktury DNA, a tym samym ekspresji. Co więcej, zasięg tych modyfikacji może być dalekosiężny – stopień metylacji odtwarzany jest bowiem w procesie kopiowania DNA i tym samym może zostać odwzorowany w kolejnym pokoleniu (Nowicka, 2007). Jak widać, dieta może mieć zatem wpływ na ekspresję DNA w kolejnych pokoleniach. W świetle tych badań teoria uwarunkowania chorób poprzez dietę przodków wydaje się dość odważna, ale nie niemożliwa (Omen i wsp. 2005, Zeisel 2007).

Prowadzone są także liczne badania z zakresu zmienności polimorficznej organizmów. Badania genetyczne nad SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) pozwalają na dzień dzisiejszy na określenie m.in. zmienności genetycznej osobników. Bada się polimorfizmy i mutacje w celu określenia genotypów/haplotypów związanych z zachorowaniem lub podwyższonym ryzykiem zachorowania na daną chorobę. Procesy metaboliczne mogą być także modyfikowane w zależności od wariantu polimorficznego u danego pacjenta. Istnieją nawet pierwsze wytyczne żywieniowe oparte na badaniach genetycznych. Ryzyko rozwoju chorób układu krążenia jest wyższe u osób spożywających zwiększone ilości PUFA (ang. *polyunsaturated-fatty-acids* – wielonienasycone kwasy tłuszczowe) i będących jednocześnie homozygotami AA w obrębie genu *APOAI* (-75G/A). U homozygot GG jest dokładnie odwrotnie. Co więcej, wariant A allelu jest silniej związany z zachorowalnością u kobiet niż u mężczyzn spożywających duże ilości PUFA (Nowicka, 2007; Omen i wsp., 2005).

Podobnie, jeśli w genie *PPARalfa* (polimorfizm Leu162Val) chorzy są homozygotami ValVal, to wzrost spożycia PUFA będzie dla nich korzystny i obniży ryzyko zachorowania na choroby niedokrwienne serca, ale już u homozygot LeuLeu i heterozygot LeuVal/ValLeu może on się wiązać z pogorszeniem gospodarki lipidowej organizmu (Nowicka, 2007).

Ciekawe są także doniesienia związane z otyłością. Według najnowszych badań ilość genów zaangażowanych w procesy związane z masą ciała i regulację metabolizmu wynosi ponad 600 (Deram, Villares 2009). Odnotowuje się związek otyłości z genem *ADRB3* (polimorfizm Trp64Arg), który związany jest z procesami energetycznymi w organizmie (Yoshida i wsp. 1995, Shiwaku i wsp. 2003, Nakamura i wsp. 2000, Xinli, Xiaomei i Meihua 2001). U homozygotycznych nosicieli wariantu Arg64 trudniej osiąga się redukcję masy ciała, choć istnieje także grupa badaczy która takiego związku nie zaobserwowała (Fumeron i wsp. 1996, Rawson i wsp. 2002). Inne badania prowadzi się nad leptyną (gen *LEP*, polimorfizm C-2549A, region 5') i jej receptorem (gen *LEPr*, polimorfizm Ser343Ser,T/C), zaangażowanych w procesy kontroli łaknienia. Trudności z pozbyciem się nadmiernej masy ciała, zwłaszcza u kobiet stosujących niskokaloryczną dietę, posiadali ci pacjenci, u których występował wariant A w pozycji C-2549A w genie *LEP*. Gen receptora *LEPr* charakteryzowała zmiana polimorficzna w pozycji Ser343Ser (T/C), która u kobiet z wariantem C powodowała większe sukcesy w odchudzaniu niż u nosicieli T (Mammes i wsp. 1998, Mammes i wsp. 2001, Luis i wsp. 2006). Z kolei, o zaangażowanie w gospodarkę lipidową podejrzewa się geny *ApoEε4* (nosiciele wariantu ε4 trudniej tracą masę ciała mimo stosowania niskokalorycznej diety) i *ApoB/VNT*, *ApoA-IV-1/2* oraz *APO A5 (T1131C)* (nosiciele wariantu c łatwiej redukowali masę ciała) (Lefevre i wsp. 1998, Heilborn i wsp. 2000, Aberle i wsp. 2005).

Ciekawym aspektem jest także to, że istnieje pewna grupa pacjentów, którzy pomimo choroby nie wykazują utraty masy ciała, a wręcz przeciwnie – cechuje ich nadwaga i otyłość. Zazwyczaj liczne biegunki sprzyjają spadkowi masy ciała - według Yamady (2006) około 10-20% pacjentów utraci nawet do 20% masy ciała z powodu NChZJ, ale istnieje grupa pacjentów z NChZJ, którzy pomimo zaawansowanej choroby będą mieli nadwagę lub otyłość. Według Mendalla i wsp. (2011) otyłość może być czynnikiem prozapalnym, sprzyjającym rozwojowi choroby. Co więcej, skłania się on nawet do wyodrębnienia pewnego rodzaju „podtypu” ChLC charakteryzującego się nadwagą. Inne doniesienie z 2010 roku (Long i wsp., 2010) badające amerykańską grupę pediatryczną z NChZJ wskazuje nawet, że jedno na pięćdziesiąt dzieci z ChLC oraz jedno na trzy z WZJG są otyłe lub mają nadwagę. Dla

dzieci ze zdiagnozowaną ChLC wiązało się to ponadto z cięższym przebiegiem choroby i częstszą potrzebą interwencji chirurgicznej.

W przypadkach chorób, gdzie istotną rolę odgrywają zaburzenia odżywiania, jak np. w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (NChZJ) ustalenie optymalnej diety, która działa np. poprzez modulację odpowiedzi cytokin zmieniając środowisko jelita, ma w ten sposób wpływ na nasilenie stanu zapalnego w jelicie. W NChZJ cechą charakterystyczną jest wzrost stężenia cytokiny prozapalnej TNF α . Istnieją liczne pokarmy, które w składzie posiadają cząstki o aktywności przeciwzapalnej, np. flawonoidy obecne w warzywach czy owocach. Mogłyby one być wykorzystywane do tłumienia stanu zapalnego w bardzo naturalny sposób – poprzez umieszczenie jej w jadłospisie pacjenta – jako uzupełnienia stosowanej farmakoterapii steroidami oraz tiopurynami (Azatiopryna, 6-Merkapatopuryna). Odpowiednio dobrana dieta jest już od dawna znanym aspektem leczenia NChZJ. Przewlekły stan zapalny w ścianie przewodu pokarmowego doprowadza do osłabionej absorpcji składników odżywczych, a w konsekwencji do stanów niedoborów pokarmowych i niedożywienia. Sytuacja jest tym bardziej poważna, jeśli dotyczy pacjentów pediatrycznych, u których tylko odpowiednia interwencja żywieniowa może zapobiec ewentualnym konsekwencjom nieodżywienia i niedorozwoju fizycznego. Stosowane w takich wypadkach żywienie parenteralne pomaga zminimalizować negatywne skutki choroby i odciążać przewód pokarmowy.

Ponieważ NChZJ, a szczególnie ChLC, należą do schorzeń o podłożu genetycznym, zaczęto się interesować, czy określona reakcja pacjenta na stosowane żywienie może mieć związek z poszczególnymi wariantami np. polimorfizmów genetycznych. Badano m.in. interakcje między terapią probiotyczną a wariantem genu *CARD15/NOD2* (Cukovic-Cavka i wsp. 2006). Inne badania poszukują związku ChLC z genem *TLR4* poprzez wpływ na szlak metaboliczny kwasów tłuszczowych (Lee Joo i wsp, 2003). Istnieją także dane na temat badań prowadzonych w zakresie nietolerancji żywnościowych a zmian SNP w regionie genomu kodującego układ HLA.

Podsumowując, badania interdyscyplinarne z pogranicza nauk żywieniowych oraz genetyki dają nam niespotykane dotąd możliwości dedykowania zaleceń

żywieniowych w zależności od wariantów genetycznych poszczególnych genów u każdego pacjenta. Nie istnieją bowiem pojedyncze produkty pokarmowe, które mogą wywierać korzystny lub negatywny wpływ na wszystkich pacjentów w ten sam sposób, tak więc opracowanie indywidualnych diet elementarnych mogłoby doprowadzić do pokrycia zapotrzebowania każdego pacjenta w sposób indywidualny. Jednoczesne rozpoznanie genetycznego problemu leżącego u podłoża zmiennej tolerancji różnych produktów pozwoliłoby na stworzenie lepszej strategii do wdrożenia terapii żywieniowej. Choć na dzień dzisiejszy wydaje się, że do zastosowania tych procedur jest jeszcze daleka droga, to w dobie szybkiego rozwoju nauki i technik badawczych można spodziewać się, że w niedalekiej przyszłości osiągnięcia naukowców skrywane przez czysto badawcze laboratoria znajdą zastosowanie także w rutynowej terapii. Optymizm w takim postrzeganiu tej nowopowstałej dyscypliny naukowej opiera się bowiem na wcześniejszych doświadczeniach z inną gałęzią nauki jaką jest farmakogenetyka. Dziś bowiem farmakogenetyka jest już coraz częściej wykorzystywana do przewidywania i optymalizacji odpowiedzi pacjentów na postępowanie lecznicze (farmakologiczne), a nutrigenetyka, jako stosunkowo młoda specjalność, ma szansę wykazać się nawet większym potencjałem.

Opublikowano: Ludwika Jakubowska-Burek, Krzysztof Linke, Agnieszka Dobrowolska-Zachwieja „Nutrigenetyka i nutrigenomika jako nowe opcje terapeutyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit” *Gastroenterologia Polska*, 2010, 17(1): 59-62

4.4. CZYNNIKI GENETYCZNE W NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT

4.4.a. RODZINNE WYSTĘPOWANIE NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT

Od dawna obserwowano częstsze występowanie NChZJ wśród rodzin pacjentów. Już w 1963 roku Kirsner i Spencer (Kirsner i Spencer 1963) donosili o częstszym rodzinnym występowaniu NChZJ. Udział czynnika genetycznego w NChZJ został udowodniony również w kolejnych badaniach rodzin pacjentów, dla których dowiedziono większego ryzyka zachorowalności jeśli posiadali oni w rodzinie kogoś z tym schorzeniem. Nie zawsze członkowie rodzin chorowali na NChZJ, ale zdecydowanie częściej cierpieli z powodu pokrewnych schorzeń ze strony układu pokarmowego (inne formy zapalenia śluzówki, choroby o podobnym obrazie klinicznym, itp.). W pracy Hugh J. Freedmana (Freedman 2002) opublikowano badania przeprowadzone na 1000 pacjentów przez okres ponad 20 lat. Aż 14% badanych deklarowało minimum jednego krewnego z ChLC. Koreluje to z wynikami innych badaczy, które przeważnie definiują grupę pacjentów z wywiadem NChZJ na 10-20% (Duerr 2002). Ciekawe jest jednak to, że przedstawioną zależność obserwuje się częściej dla pacjentów ze zdefiniowaną ChLC niż z WZJG (Yang i Rotter 1995). Badania z 2006 roku (Leedham 2006) definiują jednoznacznie, że posiadanie krewnego w pierwszej linii z rozpoznaną ChLC zwiększa ryzyko zachorowania od 15 do 35 razy, podczas gdy dla WZJG ryzyko to jest od 6 do 9 razy większe.

4.4.b. NIESWOISTE CHOROBY ZAPALNE JELIT U BLIŹNIĄT MONO- I DIZYGOTYCZNYCH

Drugim modelem badań chorób genetycznych człowieka jest model bliźniaczy (mono – i dizygotyczny). Jako naturalnie występujące w populacji ludzkie klony bliźnięta monozygotyczne dają możliwość badania zróżnicowanego wpływu

czynników zewnętrznych na taki sam genotyp. Właśnie takie badania dowiodły, że wśród bliźniąt monozygotycznych zachorowalność na ChLC wynosiła 58.3%, podczas gdy u bliźniąt dizygotycznych nie różniła się od zachorowalności obserwowanej dla rodzeństw niebliźniaczych. Dla WZJG zależności te okazały się dużo słabsze – 6.3-18.2% dla bliźniąt monozygotycznych (Tysk i wsp. 1988, Orholm i wsp. 2000).

Przedstawione powyżej dane wskazują wyraźnie, że NChZJ są schorzeniem bardzo złożonym, u podłoża których nie leży prosta zależność genetyczna. Co więcej, badania przeprowadzone na bliźniętach wskazują wyraźnie, że choroba nawet u bliźniąt monozygotycznych nie występuje w 100%, ale w około 60%. Musi zatem istnieć poważna komponenta środowiskowa bądź immunologiczna definiująca pozostałe 40%. Prawdopodobnie dopiero współwystępowanie wszystkich tych czynników powoduje zaistnienie wypadkowej w postaci choroby.

4.4.c. PODŁOŻE GENETYCZNE NIESWOISTYCH CHORÓB ZAPALNYCH JELIT

NChZJ należą do chorób wielogenowych, co oznacza, że u ich podłoża nie leży prosta mendlowska zależność (lub: prosta cecha dziedziczona w sposób mendlowski), a złożony zespół interakcji międzygenowych. Na dzień dzisiejszy uważa się, że NChZJ warunkowane są przez 30-35 genów. Według powadzonych badań wynika także, że udział czynnika genetycznego jest zdecydowanie większy dla ChLC niż dla WZJG (co potwierdzają badania na bliźniętach opisane w poprzednim rozdziale).

Pierwsze badania poszukujące w ludzkim genomie *locus* związanego z NChZJ przeprowadzono w 1996 roku. Hugot i wsp. zdefiniował wtedy region IBD, któremu w późniejszym okresie nadano numer 1, na chromosomie 16q12 (Hugot i wsp. 1996). Największym sukcesem było jednak zawężenie obszaru IBD1 do konkretnego genu związanego z ChLC w roku 2001. Ponownie zespół Hugota zdefiniował gen *NOD2*, przemianowany później na *CARD15* (Hugot i wsp. 2001). Udało im się także zdefiniować trzy podstawowe mutacje związane z ChLC: R702W, G908R oraz 1007fs. Posiadanie takich mutacji może zwiększać ryzyko zachorowania nawet 40-krotnie. W tym samym roku Ogura i wsp. dowiedli, że mutacje polegające

na zmianie ramki odczytu w genie *CARD15/NOD2* są związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ChLC (Ogura i wsp. 2001). Ponadto, mutacja inercyjna wiązana jest ze zwiększonym ryzykiem nowotworzeni u pacjentów z ChLC po 50. roku życia, a także przyczynia się do powstawania zmian ropnych.

Od czasu zidentyfikowania genu *CARD15/NOD2* obserwuje się zakrojone na szeroką skalę badania przeprowadzane na całym świecie w różnych zespołach badawczych. Początkowa nadzieja związana z genem *CARD15/NOD2* ustępuje badaniom innych genów, tak samo jak zwiększone zainteresowanie ChLC zaczyna powoli ustępować na rzecz badania czynników genetycznych warunkujących WZJG. Do dziś udało się zdefiniować 27 obszarów, w których poszukuje się genów związanych ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na NChZJ (Tabela 2).

Tabela 2. Regiony IBD w genomie człowieka (Źródło: baza NCBI - opracowanie własne).

IBD	Region	NChZJ	Gen mające lub mogący mieć związek z danym regionem IBD
IBD1	16q12	ChLC	CARD15/NOD2
IBD2	12p13.2-q24.1	ChLC, WZJG	VDR, IFN- γ
IBD3	6p21.3	ChLC, WZJG	MHCI i MHCII, TNF- α
IBD4	14q11-q12	ChLC	TCR
IBD5	5q31	ChLC	IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, CSF-2, OCTN1, OCTN2
IBD6	19p13	ChLC, WZJG	ICAM-1, C3, TBXA2R, LTB4H
IBD7	1p36	ChLC, WZJG	Rodzina TNF-R, CASP-9
IBD8	16p	WZJG	
IBD9	3p26	ChLC, WZJG	
IBD10	2q37.1	ChLC	ATG16L1
IBD11	7q22	ChLC, WZJG	MUC3A
IBD12	3p21	ChLC, WZJG	MST1, BSN, HGFR, EGFR, GNAI2
IBD13	7q21.1	ChLC, WZJG	ABCA1, MDR1
IBD14	7q32	ChLC, WZJG	IRF5
IBD15	10q21	ChLC, WZJG	

IBD16	9q32	ChLC, WZJG	TNFSF15
IBD17	1p31.1	ChLC, WZJG	IL23R
IBD18	5p13.1	ChLC, WZJG	
IBD19	5q33.1	ChLC	
IBD20	10q24	ChLC, WZJG	
IBD21	18p11	ChLC, WZJG	
IBD22	17q21	ChLC	
IBD23	1q32	ChLC, WZJG	
IBD24	20q13	ChLC, WZJG	
IBD25	21q22	ChLC, WZJG	
IBD26	12q15	WZJG	
IBD27	13q13.3	ChLC	

Skróty wykorzystane w tabeli (ang.): EGFR-epidermal growth factor, GNAI2-ingibitory guanine nucleotide binding protein, HGFR-hepatocyte growth factor, ICAM-intercellular adhesion molecule, IFN-interferon, IL-interleukin, LTBH4H-leukotriene B4 hydroksylase, MHC-major histocompatibility complex, MUC3-mucine3, TBXA2R-thromboxane A2 receptor, TCR-T-cell receptor, TNF-R-tumor necrosis factor receptor, VDR-vitamin D receptor, MDR1-multiple drug resistance 1.

Poza genami wskazanymi w Tabeli 2. jako mogącymi lub mającymi związek z NChZJ bada się ostatnio również takie geny jak: *DLG5* zlokalizowany na 10p22-23 (koduje białko szkieletowe odpowiedzialne za utrzymanie struktury komórki, reguluje jej wzrost oraz odpowiada za interakcje komórka-komórka), geny TLRs (ang. toll-like receptors), np. *TLR4* (9p33.1), *TLR5* (1q42.11), *TLR9* (3p21.2), kodujące białka błonowe odpowiedzialne za wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Ponadto, istnieją doniesienia o roli genu *PHOX2B*, zlokalizowanego na chromosomie 4p13 mającego swój udział w funkcjonowaniu komórek endokrynych nabłonka jelitowego oraz o roli genu *NCF4* (22q12.3) ważnym w produkcji reaktywnych form tlenu oraz odpowiedzi antybakteryjnej. Innym genem wiązany z zachorowaniem na ChLC jest *PTGER4* (5p13.1), kodującym receptor prostaglandyn. Innym genem podejrzanym o związki z zachorowaniem na WZJG jest *PADI4* (ang. peptidylarginine deiminase type 4) oraz *MIF-173* (ang. macrophage migration inhibitory factor). Najnowsze badanie z 2009 roku z kolei wskazuje na związek interleukiny 10 (IL10) z ChLC, zwłaszcza w odniesieniu do przypadków pediatrycznych tej choroby (Arme i wsp. 2009).

Opublikowano: „Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii”, pod red. Zygmunta Adamskiego, Krzysztofa Linke i Włodzimierza Samborskiego, Termedia Wydawnictwo Medyczne 2010.

Rozdział: Podłoże genetyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. Ludwika Jakubowska-Burek, Agnieszka Dobrowolska – Zachwieja. Str. 127-140

4.4.c.1. GEN *CARD15/NOD2*

W 1996 roku Hugot i wsp. zdefiniowali w ludzkim genomie obszar zawierający geny zaangażowane w podłoże NChZJ. Zdefiniowali ten obszar jako pericentromerowy region chromosomu 16 i nazwali go IBD1. Pięć lat później (2001 rok) dwóch niezależnych badaczy: Hugot i Ogura odkryli ten sam gen w regionie IBD1, związany z zachorowalnością na NChZJ. Początkowo gen nazwany został *NOD2*, ale w późniejszym okresie został przemianowany przez HUGO Nomenclature Committee na *CARD15*. Dziś stosowaną nazwą pozostało jednak *CARD15/NOD2*.

Liczne badania z zakresu podłoża genetycznego NChZJ wykazały, że polimorfizmy obecne w *CARD15/NOD2* są związane z chorobą Leśniowskiego-Crohna, ale wykazano także, że podatność na chorobę zależy także od pojawiających się jednocześnie zmian w innych genach. Obecnie szacuje się, że w podłożu genetycznym NChZJ zaangażowanych jest około 35 genów, przy czym większy udział czynnika genetycznego przypisuje się ChLC niż WZJG.

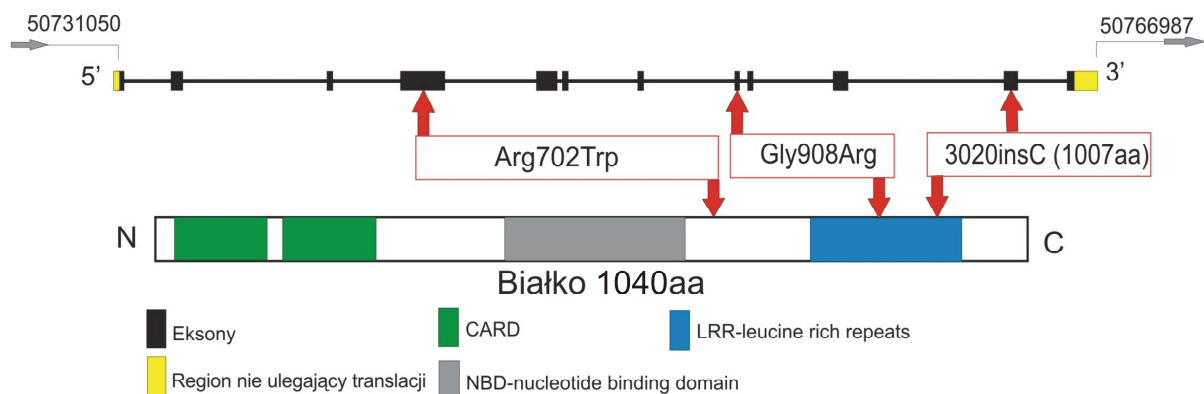
W obrębie genu *CARD15/NOD2* zidentyfikowano wiele polimorfizmów, ale jak dotąd trzy okazują się mieć największy związek z podatnością na chorobę. Są to polimorfizmy określane mianem R702W, G908R oraz 1007fs (Lesagne i wsp., 2002) (Rycina 7). Co ciekawe, w populacjach azjatyckich nie zaobserwowano tych polimorfizmów, co może potwierdzać zarówno teorię o wielogenowym podłożu choroby, jak i o zróżnicowanym jej uwarunkowaniu w różnych populacjach (Russel i wsp., 2004).

Hugot i wsp. (2001) wykazali także, że w układach homozygotycznych dla mutacji zmieniającej ramkę odczytu 3020insC w exonie 11 genu *CARD15/NOD2* ryzyko zachorowania na ChLC może wzrosnąć nawet 20-krotnie, podczas gdy w układach heterozygotycznych ryzyko to wzrasta tylko 3-krotnie. Podejrzewa się także, że mutacja 3020fs powoduje wzrost ryzyka nowotworzenia, zwłaszcza u

pacjentów powyżej 50 roku życia. Nosiciele tej mutacji mają także większe szanse rozwinięcia zmian ropnych. Omawiana mutacja powoduje skrócenie białka NOD2 powstającego na bazie genu *CARD15/NOD2* o 33 aminokwasy na końcu C-terminalnym domeny LRR. Powoduje to zmniejszenie aktywności NF- κ B. Aby proces rozpoznawania bakteryjnego lipopolisacharydu pozostał prawidłowy domena LRR powinna zostać nienaruszona. Co więcej, wg badań Russela i wsp. (2004) aż 93% wszystkich mutacji odnotowywanych w populacjach europejskich jest zlokalizowanych w domenie LRR.

Produktem genu *CARD15/NOD2* jest białko NOD2, należące do rodziny białek NOD-LRR, której cechą charakterystyczną jest region bogaty w leucyny. Wszystkie trzy mutacje wymienione powyżej (R702W, G908R oraz 1007fs) znajdują się w domenie LRR lub jej niedalekim sąsiedztwie. Może to sugerować, że wpływają one na proces rozpoznawania bakteryjnego lipopolisacharydu i tym samym wpisują się w teorię bakteryjnego podłoża ChLC.

Lokalizacja genu *CARD15/NOD2* została potwierdzona dla locus 16q12. Gen ten jest zbudowany z 12 exonów, ma 163319 par zasad i koduje białko o długości 1040 aminokwasów (Ogura i wsp. 2001). Największą polimorficznością wykazują się exony 2, 4, 6, 8, 9 i 11.



Rycina 7. Budowa genu *CARD15/NOD2* oraz białka NOD2. Zaznaczono dwa najczęstsze polimorfizmy (w tym badany Gly908Arg) i jedną mutację występującą najczęściej w odniesieniu do ChLC. Opracowanie własne.

BIAŁKO NOD2

Białko NOD2/CARD15 należy do rodziny białek wewnątrzkomórkowych, cytozolowych, biorących udział w odpowiedzi na antygeny bakteryjne. Innym członkiem tej rodziny białek jest NOD1/CARD4 będące apoptotycznym aktywatorem czynnika 1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1* - APAF1).

Białko NOD2 zaangażowane jest zarówno w apoptozę (tzw. programowaną śmierć komórki), jak i w aktywację NF- κ B (rodzina czynników transkrypcyjnych NF- κ B reguluje m.in. transkrypcję wielu genów kodujących cytokiny zaangażowane w metaboliczne szlaki zapalne (Cho, 2001). Jego ekspresja zachodzi w monocytach obwodowych, komórkach błony śluzowej jelita, a zwłaszcza w komórkach Panetha, zlokalizowanych w nabłonku jelita, których zadaniem jest produkowanie substancji antibakteryjnych w reakcji na muramyldipeptyd (MDP) i inne produkty bakteryjne.

Gram-dodatnie bakterie posiadają grubą ścianę komórkową zbudowaną z wielu warstw peptydoglikanu i kwasów teichoinowych. Z kolei bakterie Gram-ujemne mają stosunkowo cienką ścianę, również złożoną z kilku warstw peptydoglikanu, ale jest ona otoczona drugą błoną lipidową zawierającą lipopolisacharydy (LPS) oraz lipoproteiny. To właśnie część peptydoglikanowej ściany komórkowej - muramyldipeptyd (MDP) – służy do wiązania białkowej domeny LRR z bakterią. Z kolei ekspresja białka NOD2 jest regulowana przez cytokiny TNF- α i IFN- γ . Zarówno TNF- α jak i IFN- γ mają wpływ na jądrowy czynnik kappa B (NF- κ B), powodując wzrost jego reaktywności na bakteryjny LPS. TNF- α jest odpowiedzialny za wiązanie NF- κ B w regionie promotorowym *CARD15/NOD2*. Jakakolwiek zamiana w sekwencji w tym regionie powoduje zmniejszenie aktywności TNF- α .

Białko NOD2 zbudowane jest z dwóch domen N-terminalnych, domeny wiążącej nukleotydy (ang. nucleotide-binding domain (NBD), oraz końca C-terminalnego zawierającego 10 powtórzeń LRR (ang. leucine rich repeats, obszary bogate w leucynę) zbudowanych z 27 aminokwasów. Fizycznie domena LRR jest zdolna do interakcji z bakteryjnymi lipopolisacharydami i aktywacji NF- κ B.

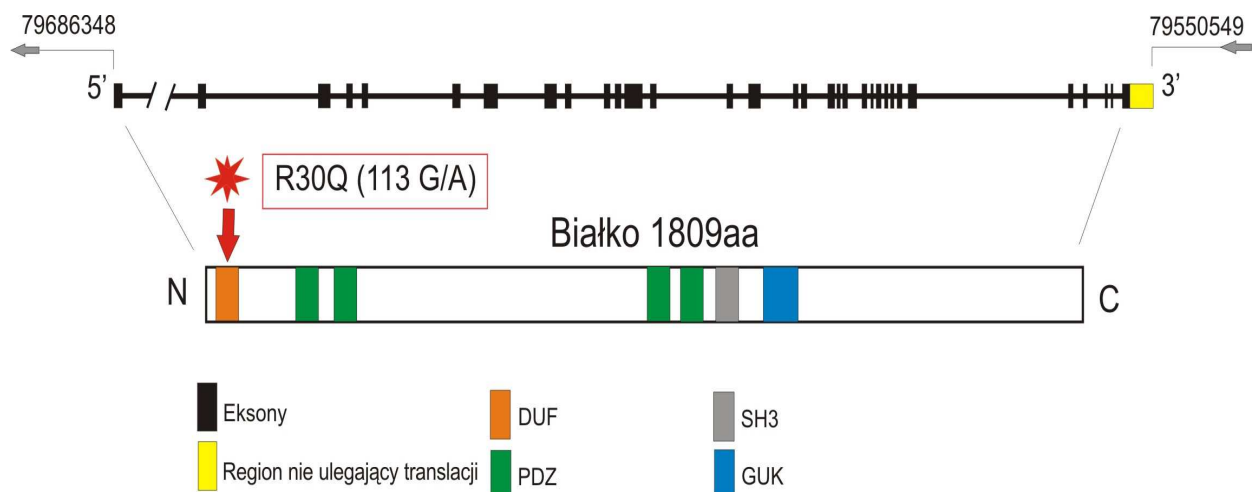
Badania prowadzone na modelach mysich NChZJ w National Institute of Allergy and Infectious Diseases pod przewodnictwem doktora Warrena Strobera

dowodzą, że myszy z knock-outem NOD2 wykazywały bardzo silne stany zapalne związane z innym receptorem TLR2 (ang. toll-like receptors). Receptor TLR2 to białko obecne w ścianie jelita; jest ono odpowiedzialne za rozpoznawanie patogennych bakterii i rozpoczęcie kaskady reakcji informujących organizm o infekcji. W normalnych warunkach stan zapalny zapoczątkowany sygnałami z TLR2 jest pod kontrolą białka NOD2, ale gdy białko NOD2 jest zmutowane i nie funkcjonuje prawidłowo, stan zapalny staje się chroniczny i nie ma czynnika, który mógłby go wyciszyć.

W niniejszym projekcie przeprowadzono analizę polimorfizmu typu SNP zlokalizowaną w pozycji 2827 C>G (G908R) w obrębie genu *CARD15/NOD2*.

4.4.c.2.GEN I BIAŁKO DLG5

Gen *DLG5* został zmapowany na chromosomie 10 w roku 1998 przez zespół Nagase. Jeszcze tego samego roku Nakamura i wsp. zdefiniowali loci tego genu jako 10q23, co potwierdziły badania Hampe i wsp. w 1999 roku. Gen *DLG5* zbudowany jest z 135 800 par zasad (Rycina 8), 32 eksonów koduje natomiast transkrypt wielkości 7.2 KB. Zdefiniowano dwa warianty „splicingu” („składania”) tego genu.



Rycina 8. Budowa genu i białka DLG5. Zaznaczono badany polimorfizm. Opracowanie własne.

Białko DLG5 kodowane przez gen *DLG5* składa się z 1809 aminokwasów i jest członkiem rodziny białek MAGUK (ang. Membrane Associated Guanylate Kinases). Białka te są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów międzykomórkowych. Zawierają motyw PDZ, domeny SH3 i region homologiczny GUK (ang. guanylate kinase (GUK) homologous region). Zarówno domeny PDZ i GUK są odpowiedzialne za interakcje międzybiałkowe. Poprzez przeszukiwanie bazy danych EST w celu zidentyfikowania homologów sekwencyjnych drosophilowego *dlg* naukowcy (Nakamura i wsp. 1998) zidentyfikowali cDNA kodujący nowy ludzki homolog. Analiza northern-blot wykryła transkrypt o wielkości 9.4 kb o wysokiej ekspresji w łożysku, prostatie i kilku innych tkankach. Tym samym zdefiniowano gen PDLG (ang. placenta (łożysko) and prostate (prostata) *DLG*). Dodatkowo, odkryto mRNA wielkości 8.8-kb należący do PDLG. Wykazywał on ekspresję w tarczycy. Jego 859-aminokwasowe białko PDLG zbudowane było z trzech domen PDZ, domeny SH3 i regionu GUK. Ponadto, białko PDLG wykazuje homologię do DLG1 i *Drosophila* *dlg* w odpowiednio 45% i 40%. Analiza western-blot ludzkich ekstraktów tkankowych wykazała, że PDLG ma masę 105kD. Z kolei doświadczenia immunofluorescencyjne wskazały lokalizację tego białka w cytoplazmie i błonie komórkowej, oraz wykazały jego ekspresję w gruczołach nabłonkowych normalnej tkanki prostaty, ale nie były one już obecne w liniach komórkowych prostaty.

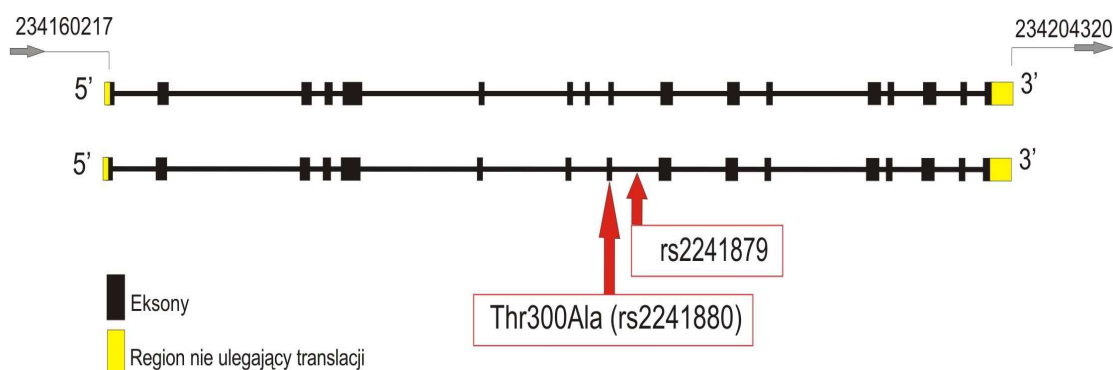
W roku 1998 Nakamura i wsp. odkryli, że PDLG reaguje z domeną GUK białka p55. Autorzy sugerują, że te dwa białka tworzą heterodimerski kompleks MAGUK w błonie komórkowej i wiążą molekuly odgrywające rolę w utrzymywaniu struktur komórek nabłonkowych. Białko DLG5 koduje struktury cytoszkieletowe odpowiedzialne za utrzymywanie integralności komórek. Jeden z wariantów DLG5 zawierający polimorfizm G/A w pozycji 113 powoduje substytucję aminokwasową Arg30Gln (R30Q) w domenie DUF622 białka DLG5 (Stoll i wsp. 2004). Mutacja ta upośledza proces zwijania białka.

Ciekawe jest także to, że jednoczesna obecność wariantów ryzyka w genie *CARD15/NOD2* (3020insC; G908R; R702W) i wariantu 113A powodowała znaczny wzrost ryzyka zachorowania na NChZJ. Jest to dowód na istnienie oddziaływania gen-gen i wielogenowy charakter choroby.

W niniejszym projekcie przeprowadzono analizę polimorfizmu typu SNP zlokalizowaną w pozycji 113 G>A (R30Q) w obrębie genu *DLG5*.

4.4.c.3. GEN I BIAŁKO ATG16L1

Gen *ATG16L1* (ang. Autophagy 16-like 1) jest położony w locus 2q37.1. Jest on składnikiem dużego kompleksu zaangażowanego w procesy autofagocytozy. Mizushima i wsp. (Mizushima i wsp. 2003) sklonował myszy *Atg16l1*, który koduje białko zbudowane z 623 aminokwasów. Odkrył on także 2 izoformy tego białka (Rycina 9).



Rycina 9. Budowa genu *ATG16L1*. Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

Region N-terminalny genu *Atg16l1* wykazuje homologię do genu *Apg16* u *Saccharomyces cerevisiae*, podczas gdy region C-terminalny nie wykazuje już zbieżności z białkami *S. cerevisiae*. Kolejne analizy przeprowadzone przez ten sam zespół badaczy zidentyfikowały ludzki transkrypt genu *ATG16L1* kodujący 588 – aminokwasowe białko, korespondujące z krótszą izoformą mysiego genu *Atg16l1*. Analiza western-blott mysich tkanek wykazała obecność 63-kD oraz 71-kD białka *Atg16l1* w wątrobie, nerkach, śledzionie, tarczycy, jądrach i embrionalnych komórkach macierzystych, natomiast wersje 75-kD tego białka zaobserwowano w tkankach mózgu, mięśni szkieletowych oraz serca.

Rok później (2004) Zheng i wsp. zdefiniowali cDNA dla genu *ATG16L1*. Wykryli, że 607-aminokwasowe białko o masie 68.2 kD wykazuje zgodność z jedną z

mysich izoform Atg16l1 w 90%. Kolejne analizy wykazały, że gen *ATG16L1* może kodować trzy warianty białkowe zbudowane odpowiednio z 470, 504 i 523 aminokwasów.

Gen *ATG16L1*, razem z innym kluczowym genem zaangażowanym w procesy autofagocytozy – *ATG5* – jest niezmiernie ważny dla prawidłowego funkcjonowania komórek Panetha. Komórki Panetha to wyspecjalizowane komórki nabłonka jelitowego, które pełnią funkcje wydzielnicze substancji antybakteryjnych oraz szeregu czynników mających za zadanie zmienianie środowiska jelitowego (Kubala i wsp. 2008, Cadwell i wsp. 2009).

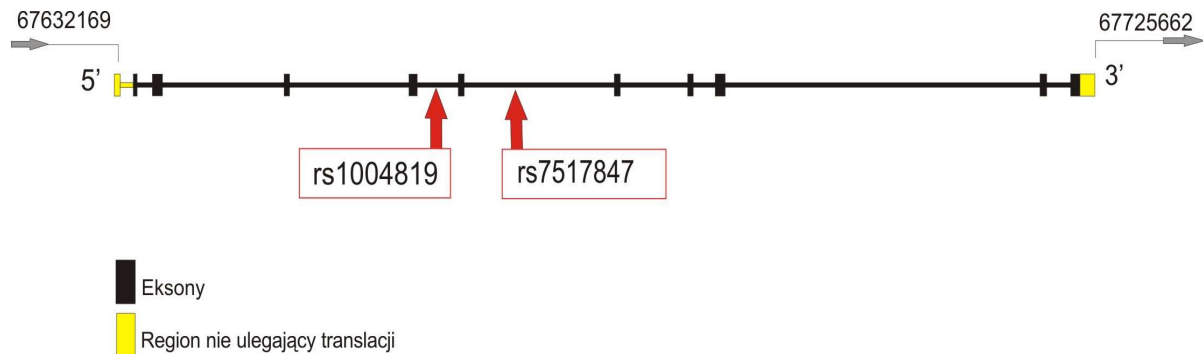
Komórki Panetha wykazujące deficyt Atg16L1 i Atg5 charakteryzują znaczne nieprawidłowości w szlakach egzocytozy. Co więcej, analiza transkrypcyjna ujawniła niespodziewany wzrost ekspresji genów zaangażowanych w szlaki sygnałowe PPAR (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) i metabolizm lipidów, czynniki ostrej fazy i dwie adipocytokiny: leptynę i adiponektynę (Cadwell i wsp. 2008). Okazuje się także, że pacjenci z ChLC homozygotyczni dla allelu ryzyka w genie *ATG16L1* wykazują nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek Panetha podobne do tych obserwowanych w modelach mysich pozbawionych białek autofagocytozy, jak również obserwuje się u nich zwiększony poziom leptyny (Grant, Baldassano i Hakonarson, 2008). Według Cadwella i wsp. gen *ATG16L1* odgrywa prawdopodobnie kluczową rolę w podłożu ChLC wpływając na właściwości regulatorowe komórek Panetha.

W niniejszym projekcie analizowano polimorfizmy typu SNP oznaczone w nomenklaturze „rs” jako rs2241880 (znany także jako Thr300Ala) oraz rs2241879.

4.4.c.4. GEN I BIAŁKO IL23R

Gen *IL23R* położony jest w locus 1p31.1 i zbudowany jest z 10 eksonów (Rycina 10). IL23 jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek: p19 (IL23A) i p40 (IL23B). Podjednostka p40 może oddziaływać z p35 (IL12A) tworząc IL12. IL23, podobnie jak IL12, wiąże się z IL12RB1, ale tylko IL12 ma zdolność

wiązania się z IL12RB1. IL23R nie wykazuje interakcji z IL12, ale może parować się z IL12RB1 nadającą jej cechy reaktywności (Parham i wsp. 2002).



Rycina 10. Budowa genu *IL23R*. Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

Dzięki analizie PCR biblioteki cDNA Parham i wsp. (2002) zdołali zidentyfikować cDNA o wielkości 2.9kb kodujący IL23R. Białko transmembranowe o wielkości 629 aminokwasów powstające na bazie tej sekwencji wykazuje pewną homologię do IL12RB1. Analiza western-blott oraz RT-PCR ujawniły ekspresję 2.9-kb transkryptu w komórkach Th1, Th0, NK oraz nieco mniejszą ekspresję w monocytach, dendrytach i limfocytach B.

Gen *IL23R* został także zidentyfikowany jako jeden z genów podatności na ChLC przez zespół badawczy prowadzony przez Duerra w 2006 roku (Duerr i wsp. 2006). Wykazali oni znaczną asocjację pomiędzy chorobą Leśniowskiego – Crohna a genem *IL23R*, przy czym jeden z wariantów kodujących (R381Q) był zdecydowanym czynnikiem ochronnym przed zachorowaniem na ChLC. Zidentyfikowano także inne warianty niekodujące w sekwencji *IL23R* wykazujące asocjację z ChLC. Rok później Libioulle i wsp. (Libioulle i wsp. 2007) wykonali zakrojony na szeroką skalę projekt badawczy analizując ponad 300,000 polimorfizmów typu SNP u ponad pół tysiąca pacjentów z ChLC należących do populacji kaukaskiej. Badania wykazały najsilniejszy związek markerów z rejonu *IL23R*, m.in. rs11209026 (R381Q).

W 2007 roku Rioux i wsp. zdefiniowali kolejny polimorfizm związany ze zwiększonym zachorowaniem na ChLC – rs7517847 (Rioux i wsp. 2007). W tym samym roku Glas i wsp. (Glas i wsp. 2007) przeanalizowali 10 wariantów *IL23R*

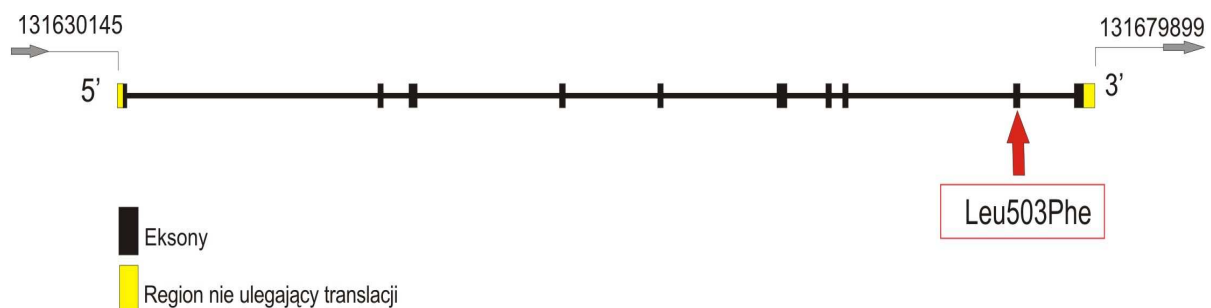
wykazujących asocjację z ChLC w innych badaniach i potwierdzili dotychczasowe doniesienia. Co więcej, 8 z 10 polimorfizmów wykazywało również asocjacje dla *colitis ulcerosa*. Nie udało im się jednak wykazać epistazy pomiędzy badanym genem a *CARD15/NOD2*, *OCTN1* czy *OCTN2*. Ponadto (Babista i wsp. 2008), w populacji brazylijskiej dowiedziono zależności między *CARD15* a *IL23R*.

Według niektórych badań gen *IL23R* wykazuje także związek z łuszczycą (Cargill i wsp. 2007, Capon i wsp. 2007). Ponieważ zarówno ChLC jak i łuszczycyca wydają się mieć chociaż w pewnym stopniu podobną genezę, poznanie pewnych mechanizmów leżących u podłoża zachorowań na oba schorzenia może okazać się kluczowe.

W niniejszym projekcie przeprowadzono analizę polimorfizmów typu SNP zlokalizowanych w pozycjach oznaczonych wg nomenklatury systemem „rs” jako rs7517847 oraz rs1004819 w obrębie genu *IL23R*.

4.4.c.5. GEN I BIAŁKO OCTN1

Gen *OCTN1*, znany jest także jako *SLC22A4* (ang. solute carrier family (organic cation transporter 1), member 4). Koduje on 551-aminokwasowe białko zbudowane z 11 domen transbłonowych, domeny wiążącej nukleotydy, konserwatywnego fragmentu transportera cukrowców, 4 miejsc N-glikozylowanych oraz 5 fosorylowanych miejsc białkowej kinazy C. Zbudowany jest z 49 755 par zasad (Rycina 11).



Rycina 11. Budowa genu *OCTN1*. Zaznaczono badany polimorfizm (1672C/T, L503F).

Opracowanie własne.

OCTN1 jest w 33% identyczny z *OCT2* (*SLC22A2*) i w 31% identyczny z *OCTN1* (*SLC22A1*). Analiza Northern-blott wykazała obecność 2,5-kb transkryptu *OCTN1* w kilku tkankach zarówno płodowych jak i u dorosłych osobników. Największy poziom białka powstającego na bazie genu *OCTN1* wykazano w płodowej wątrobie, oraz nerkach, tchawicy i szpiku kostnym dorosłych osobników. Ekspresję na wysokim poziomie zanotowano także w niektórych ludzkich liniach nowotworowych. W 1997 roku Tamai i wsp. (Tamai i wsp. 1997) zaproponowali teorię, w której *OCTN1* jest nerkowym protonowym antyporterem jonów organicznych funkcjonującym w wierzchniej warstwie nabłonka.

W 2000 roku Rioux i wsp. zidentyfikowali trzy regiony w ludzkim genomie (3p, 5q31-q33, oraz 6p) związane z ChLC. Szczegółowa analiza wykazała, że w locus 5q31-33 zlokalizowany jest czynnik odpowiedzialny za wczesny początek choroby. Dalsze badania zawężyły wcześniejszy region do locus 5q31. W 2003 roku (Mirza i wsp. 2003) wykazano, że region ten nie ma związku z zachorowalnością na WZJG, ale udowodniono, że ryzyko zachorowania na ChLC wzrastało znacznie u osób, które wykazywały obecność minimum jednego z wariantów chorobowych w genie *CARD15/NOD2* (obecność 1 lub 2 mutacji). Ryzyko wzrastało jeszcze bardziej, kiedy chory z mutacją w genie *CARD15/NOD2* wykazywał układ homozygotyczny dla allelu ryzyka w locus 5q31. W tym samym roku (Giallourakis i wsp. 2003, vanHeel i wsp. 2003, McGovern i wsp. 2003) pojawiły się doniesienia, że gen *OCTN1* może mieć jednak związek z zachorowalnością na WZJG. Co więcej, wykazano, że choć oba te geny wpływają na ryzyko zachorowania na NChZJ niezależnie, to mogą one wykazywać swoistą epistazę w działaniu. Autorzy teorii sugerują, że region IBD5, w którym mieści się gen *OCTN1*, może odgrywać kluczową rolę w zachorowaniu na NChZJ, przy jednoczesnym wpływie genu *CARD15/NOD2* na obraz kliniczny choroby.

W 2004 roku Peltekova i wsp. (Peltekova i wsp. 2004) wskazali genotypy 1672C-T (L503F) oraz -207G-C (region promotorowy) związany ze zwiększoną zachorowalnością na ChLC w genie *OCTN1*. Obecność tych wariantów wpływa na zmianę transkrypcji oraz tym samym na zmianę funkcjonowania transportera kodowanego przez gen *OCTN1*. Potwierdzono także związek genotypów obecnych w genie *OCTN1* z wariantami genu *CARD15/NOD2* i zwiększoną zachorowalnością na

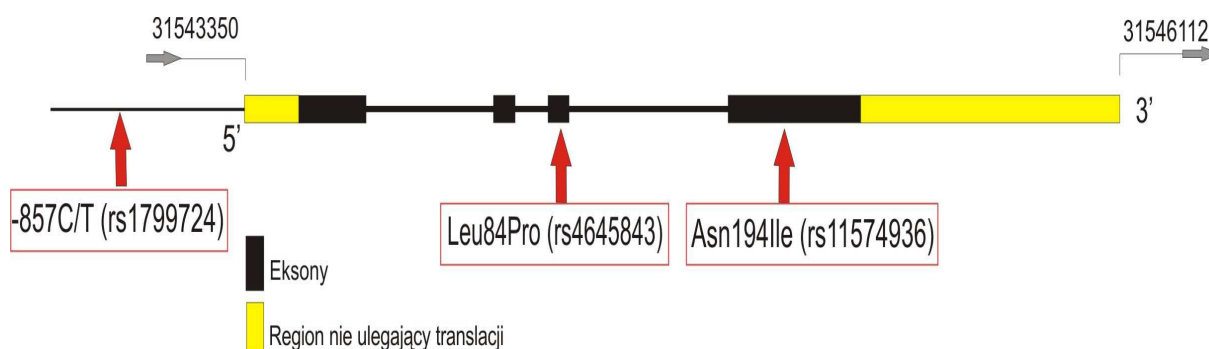
ChLC. Badania przeprowadzone przez Wellcome Trust Case Control Consortium w 2007 roku potwierdziły dotychczasowe doniesienia.

W niniejszym projekcie przeprowadzono analizę polimorfizmu typu SNP zlokalizowaną w 1672 C>T (F503L) w obrębie genu *OCTN1*.

4.4.c.6. GEN I BIAŁKO TNF α

Czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis alpha, TNF) jest wielofunkcyjną cytokiną prozapalną wydzielaną głównie w monocytach/makrofagach, wpływa na metabolizm lipidów, koagulację, odporność na insulinę i funkcję śródbłonna. Zlokalizowany jest w locus 6p21.3, zbudowany z 4 eksonów (Rycina 12).

Pierwotnie zidentyfikowany w mysim serum, został potwierdzony w licznych badaniach jako czynnik zaangażowany w warunkowanie wielu chorób człowieka, m.in. autoimmunologicznych, np. łuszczycy, reumatycznego zapalenia stawów, zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, NChZJ, ale także gruźlicy, torbielowatości nerek, oraz procesach nowotworowych. Zaangażowany w procesy podziału i różnicowania komórek oraz apoptozy. Syntetyzowany jest jako 26-kD białko błonowe (pro-TNF) cięte enzymatycznie z uwolnieniem 17-kD cząstki, wykazującej zdolność do wiązania z receptorami TNFR1 i TNFR2. Badania knock-out prowadzone na modelach zwierzęcych sugerują funkcję neuroprotekcijną *TNF α* .



Rycina 12. Budowa genu *TNF α* . Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

W 2000 roku Koss i wsp. (Koss i wsp. 2000) zaobserwowali, że polimorfizm G/A w regionie promotorowym genu *TNFalfa* w pozycji -308 występuje znacznie częściej u kobiet z dystalną formą NChZJ niż u mężczyzn dotkniętych tą samą formą choroby. Asocjacja była wręcz silniejsza jeśli u tych samych kobiet zaobserwowano jednocześnie wariant A (polimorfizm A/C) w pozycji 720 w genie *LTA* (gen ten jest bardzo podobny w budowie do *TNFalfa*, budują go także 4 eksony, a większość, bo około 80% białka budowanego na bazie tego genu wykazuje homologię w 56% pomiędzy oboma tymi genami). Polimorfizm ten wykazywał także asocjację ze zwiększoną produkcją TNF zaobserwowaną także wśród pacjentów z ChLC, podczas gdy u chorych na WZJG w pozycji -238 genu *TNFalfa* obserwowano znacznie częściej wariant nukleotydowy A zamiast G, co skutkowało obniżeniem produkcji cytokiny TNF. W obrębie tego genu badano liczne polimorfizmy, między innymi w regionie promotorowym tego genu (m.in. -238G/-238A, -308G/-308A, i -376G/-376A), w odniesieniu do bardzo różnych chorób człowieka, m.in. łuszczycy, tuberkulozy, reumatycznego zapalenia stawów, zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, NChZJ, gruźlicy, torbielowatości nerek, procesach nowotworowych, otyłości, chorób serca, malarii i jej powikłań mózgowych, osteoporozy, astmy czy żółtaczki typu B.

W niniejszym projekcie postanowiono sprawdzić wybrane trzy polimorfizmy i ich ewentualny związek z zachorowalnością i przebiegiem ChLC, oraz obrazem klinicznym choroby. Wybór polimorfizmów typu SNP został wykonany na bazie istniejącej w tym zakresie literatury. Do analizy typu multilocus w obrębie genu *TNFalfa* zostały wybrane polimorfizmy w pozycji c.-857C>T, c.420C>T(Leu84Pro), oraz c.750A>T (Asn194Ile).

Opublikowano: Ludwika Jakubowska-Burek, Marcin A. Kucharski, Marta Kaczmarek, Justyna Hoppe-Gołębiowska, Oliwia Zakerska, Krzysztof Linke, Ryszard Słomski, Michał Drews, Ryszard Marciniak, Agnieszka Dobrowolska-Zachwieja „Evaluation of the prognostic usefulness of 420C/T, 750A/T, -857C/T polymorphisms in the *TNFalpha* gene among Polish patients with Crohn's disease – original paper” - *Przeegląd Gastroenterologiczny* 2009; 4(6), 298-301

4.4.d. POLIMORFICZNOŚĆ JAKO CECHA WYSTĘPUJĄCA NATURALNIE W POPULACJI – POLIMORFIZM POJEDYNCZEGO NUKLEOTYDU (SNP)

W obrębie wszystkich przedstawionych w poprzednim rozdziale genów bardzo często można zaobserwować obecność cech polimorficznych oraz mutacji. Polimorfizmy to naturalnie występujące w ludzkim genomie różnice w sekwencji nukleotydowej warunkujące zmienność genetyczną. Badania nad polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNPs – ang. single nucleotide polymorphisms) w sekwencji nici DNA dają nam odpowiedź na trzy podstawowe pytania: po pierwsze, określają częstość występowania poszczególnych wariantów alleli w różnych populacjach, po drugie, dają informację na temat ewentualnych zmian funkcjonalnych spowodowanych substytucją (zmiana kodonu kodującego aminokwas) i po trzecie, określają zależne położenie poszczególnych wariantów w genomie i ich ewentualne zależności (Cho i Weaver 2007). W odniesieniu do ChLC wiele ośrodków badawczych zajmuje się tematyką występowania określonych zmian polimorficznych w odniesieniu do NChZJ, próbując określić cechy podatności na zachorowanie, przebieg choroby oraz podatność na leczenie farmakologiczne.

Polimorfizmy typu SNP nie zawsze muszą powodować zmianę aminokwasu w sekwencji białka powstającego na bazie sekwencji DNA; bardzo często zdarza się, że są to zmiany „nieme” – nie powodujące zmian funkcjonalnych. Z jakiś powodów występują one jednak w sekwencji i są przekazywane na kolejne pokolenia. Uważa się, że mogą one być swoistym markerem, który definiuje np. podatność na zachorowanie, podatność na leczenie farmakologiczne czy predyspozycje do zaistnienia określonych objawów klinicznych choroby.

4.4.e. PORADNICTWO GENETYCZNE W NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT

Wraz ze stałym wzrostem zachorowań na NChZJ w ostatnich latach pojawił się problem poradnictwa dla osób z tym schorzeniem. Pomimo tego, że nie ma ustalonego dokładnego modelu przenoszenia się choroby z rodziców na dzieci, to wiadomo, że ryzyko to jest dla nich większe (nawet 40-krotnie). Wzrasta ono

dodatkowo, jeśli oboje rodziców choruje na NChZJ, jeśli mają oni w rodzinie inne osoby cierpiące na tę chorobę, jeśli choroba pojawiła się w trzeciej dekadzie życia lub jeśli rodzice mają przodków wywodzących się z populacji Żydów Aszkenazyjskich (Karban, Eliakim i Brant, 2002). Z danych bazujących na praktyce klinicznej można stwierdzić, że u chorych dzieci, które mają obojga rodziców z NChZJ, diagnoza zostanie postawiona szybciej niż w przypadkach, gdy wywiad rodzinny nie jest obciążony. Ponadto, częściej choroba zajmie obszar jelita cienkiego niż grubego i będzie można zaobserwować więcej objawów chorobowych spoza przewodu pokarmowego. Istnieje także większe ryzyko perforacji, jako powikłania choroby. (Cummings i Rubin, 2006).

Pacjenci, którzy spełniają kryteria podwyższonego ryzyka zachorowania na NChZJ powinni być informowani o udziale czynników środowiskowych (dodatkowych), mogących wpłynąć na pogorszenie ich stanu zdrowia, np. palenia tytoniu. Nie można jednak na dzień dzisiejszy zaproponować im testów (np. genetycznych), które pozwoliłyby jednoznacznie określić stopień ryzyka rozwinięcia się u nich choroby.

Wszelkie działania prowadzone przez liczne grupy badaczy zmierzają do coraz dokładniejszego określenia ryzyka oraz czynników odpowiedzialnych za pojawienie się choroby, ale ponieważ pozostają one wciąż w sferze badań, osoby z NChZJ powinny być przede wszystkim objęte opieką kliniczną.

5. METODYKA

5.1. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Badana grupa składała się tylko z osób dorosłych (najmłodszy badany miał 18 lat, najstarszy 82). Do badań zakwalifikowano 160 pacjentów z rozpoznaną chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wszyscy byli poddani analizie typu *multilocus*, czyli każdego z badanych przeanalizowano w zakresie 10 zmian polimorficznych typu SNP (ang. single nucleotide polymorphism) obecnych w genomie. Wszyscy chorzy - 80 kobiet i 80 mężczyzn - wyrazili zgodę na udział w projekcie badawczym. Do porównywania wyników użyto odpowiednio dobranej grupy populacyjnej w ilości od 100 do 150 osób (zawsze po równo kobiet i mężczyzn).

Pacjenci, którzy wzięli udział w badaniu, byli pod opieką Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W większości pochodzili z obszarów Wielkopolski. Chętnie brali udział w projekcie badawczym, gdyż obejmował ich dodatkową opieką, dawał możliwość bezpłatnego wykonania szeregu badań, które nie są standardowo wykonywane w ramach oddziałów szpitalnych. Wielu z nich prosiło także o objęcie programem ich bliskich, zwłaszcza dzieci. W ten sposób objęliśmy programem badawczym całe rodziny i nadal tworzymy rodzinny bank DNA pacjentów dotkniętych ChLC. W ramach niniejszego opracowania zaprezentowane zostały jednak tylko wyniki uzyskane dla zdiagnozowanych pacjentów z ChLC. Analizę rodzin chorych planujemy wykonać w ramach innego projektu.

Mam jednocześnie nadzieję, że prowadząc badania o tak szerokim zakresie analizowanych czynników choć w niewielkim stopniu przyczynię się do poprawy jakości życia Naszych Pacjentów. Często wykazują oni chęć uzyskania wiedzy na temat wariantów genetycznych, których są nosicielami. Chcą mieć świadomość, jaki wariant – ryzykowny czy ochronny – noszą ich dzieci, aby móc w odpowiednim momencie zareagować i nie przeoczyć pierwszych objawów. Pacjenci zawsze byli informowani o tym, że badania genetyczne na dzień dzisiejszy nie mogą stanowić jednoznacznej diagnozy i, jako że są badaniami naukowymi, nie mogą być traktowane jako badanie diagnostyczne, ale w znakomitej większości zawsze wyrażali chęć wzięcia w nich udziału. Sądzę, że taka postawa Naszych Pacjentów

jest także wskaźnikiem tego, że świadomość chorych w ostatnich latach znacząco wzrosła i że w niedalekiej przyszłości badania genetyczne będą jednymi z tych, których chorzy będą oczekiwać od prowadzących ich lekarzy. Mam zatem nadzieję, że niniejszy projekt będzie swoistym początkiem współpracy, która przyniesie wymierne korzyści nie tylko dla nauki, ale, a może zwłaszcza, dla samych pacjentów.

5.2. MOLEKULARNE METODY BADAWCZE

Z pacjentami zostały przeprowadzone szczegółowe wywiady lekarskie dotyczące objawów choroby, zarówno tych z obszaru przewodu pokarmowego jak i spoza niego. U każdego chorego aktywność choroby oceniono za pomocą CDAI (ang. Crohn Disease Activity Index). Od każdego z badanych pacjentów została pobrana krew do szerokiego spektrum badań laboratoryjnych oraz badań genetycznych, które przeprowadzono w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Do badań wykorzystano najnowsze metody diagnostyczne, w tym jeden z nielicznych w Polsce sprzęt do pirosekwencjonowania. Ponadto, wszystkie dane zostały przeanalizowane statystycznie.

Wszyscy byli poddani analizie typu *multilocus*, czyli każdego z badanych przeanalizowano w zakresie 10 zmian polimorficznych typu SNP (ang. single nucleotide polymorphism) obecnych w genomie. Dla grupy około 60 chorych nie udało się zebrać szczegółowego wywiadu lekarskiego wystarczającego kryteriom postawionym temu projektowi badawczemu, i dlatego zostali oni włączeni tylko do analizy genetycznej. Pozostała grupa została poddana analizie genetycznej w porównaniu z konkretnymi objawami klinicznymi choroby, zastosowanym leczeniem itp. Wszyscy badani wyrazili zgodę na udział w projekcie badawczym, wielu do dziś pozostaje z nami w stałym kontakcie i zgłasza się na ochotników do kolejnych projektów. Dowodzi to dużego zainteresowania chorych tą problematyką, chęci pogłębiania przez nich wiedzy na temat własnego organizmu i choroby, która ich dotknęła. Rodzi to nadzieję, że w niedalekiej przyszłości badania genetyczne będą wykonywane rutynowo, także na wyraźne życzenie i zapotrzebowanie samych chorych. To dla nich bowiem i dla ich rodzin powstał ten projekt, mający na celu

przyczynić się do poprawienia diagnostyki i przewidywania przebiegu choroby pacjentów poznańskich szpitali i ich dzieci.

5.2.a. IZOLACJA WYKOCZĄSTECZKOWEGO DNA Z KRWI

Badania genetyczne zaplanowane dla tego projektu naukowego zostały przeprowadzone na DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) izolowanym z leukocytów krwi obwodowej pacjentów zakwalifikowanych do badań w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. DNA zostało również wyizolowane od osób stanowiących grupę porównawczą dla otrzymanych rezultatów. Głównym celem izolacji jest otrzymanie wysokocząsteczkowych izolatów DNA o maksymalnej czystości. Izolacja powinna być przeprowadzona tak, aby w miarę możliwości oczyścić preparat z białek oraz inhibitorów enzymów, które w późniejszych etapach pracy z materiałem genetycznym mogą zakłócać wyniki. Krew pobierana jest do probówki z EDTA (ang. EthyleneDiamineTetraaceticAcid - kwas etylenodiaminotetraoctowy), chelator dwuwartościowych jonów wapnia, co zapobiega pozaustrojowemu krzepnięciu krwi.

Wybrano metodę izolacji DNA z zastosowaniem izotiocyjanianu guanidyny (GTC), (Słomski i wsp. 2008). Do wykonania pełnych badań tą metodą wystarcza już 1 ml krwi, ale badanie dla każdego pacjenta wykonywano z 5 ml krwi obwodowej, zapewniając sobie tym samym wysokie stężenie preparatu wystarczające na szereg analiz.

Izolacja została przeprowadzona według następującego schematu (Słomski i wsp. 2008).

1. Pobrać krew obwodową w ilości 5 ml na 50 µl 10% EDTA (stężenie końcowe 0,1 %).
2. Dodać 25 ml buforu do lizy (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7,4). Mieszać, inkubować na lodzie przez 30 minut. Bufor do lizy (1000 ml): 8,28 g NH₄Cl, 1g KHCO₃, 0,034g EDTA, pH 7,4)

3. Wirować w wirówce Srovall RT6000B: 2500 rpm, 15 min, 4 st. C
4. Odrzucić supernatant.
5. Osad zawiesić w 500 ul buforu do lizy, dokładnie wymieszać i inkubować w temperaturze 0 st. C przez 10 minut.
6. Dodać 2 ml GTC (4M izotiocyanian guanidyny, 34 mM cytrynian sodu, 0,5% sarkosyl, 0,78% 2-merkaptoetanol, pH 7,0), dokładnie wymieszać, inkubować 15 minut na lodzie. GTC (100 ml): 47, 26g GTC, 0,735g cytrynianu sodu, 0,5g sarkosylu, 0,78 ml 2-merkaptoetanolu, pH 7,0)
7. Dodać 2,5 ml mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (25:24:1), pH 8.0. Dokładnie wymieszać.
8. Wirować 3000 rpm przez 15 minut w 4 st. C. Zebrać supernatant.
9. Dodać 2,5 ml chloroformu, dokładnie wymieszać.
10. Wirować 3000 rpm przez 15 minut w 4 st. C. Zebrać supernatant.
11. Dodać 5 ml 96% etanolu (-20 st. C). Delikatnie wybujać probówkę aż pojawi się osad. Zebrać osad.
12. Przemyć osad dwukrotnie po 500 ul 80% alkoholu etylowego.
13. Wyszuszyć osad, a następnie rozpuścić w 200 ul sterylnej wody.

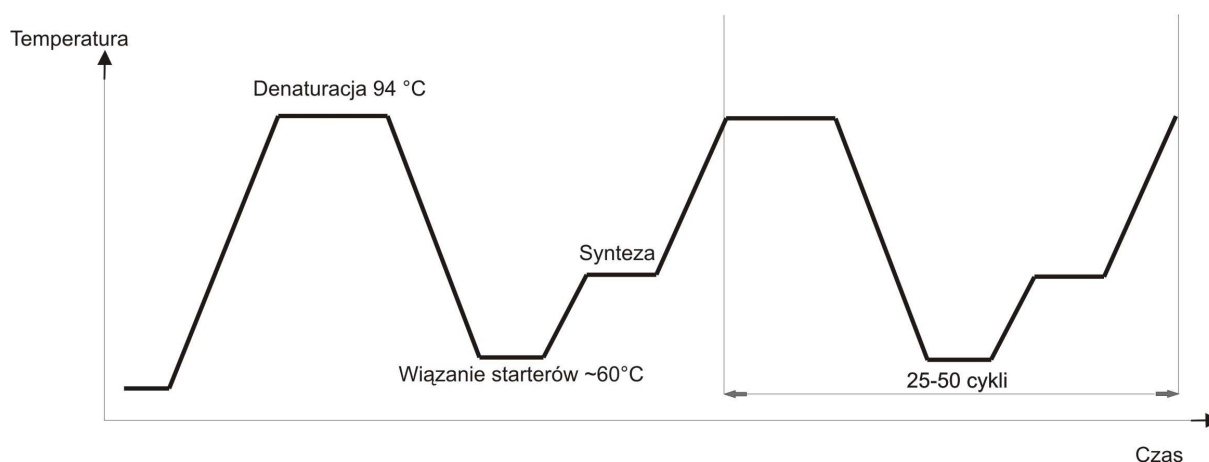
Tak otrzymane izolaty DNA należy następnie doprowadzić do wspólnego stężenia. Stężenie było mierzone w aparacie Nanodrop, a następnie ustalane do wartości wyjściowej 500 ng/ul w stocku.

5.2.b. AMPLIFIKACJA DNA PRZY ZASTOSOWANIU REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) to metoda pozwalająca na namnożenie interesującego nas fragmentu będącego przedmiotem dalszej analizy. Polega na ograniczeniu badanego fragmentu sekwencji

nukleotydowej poprzez startery F (ang. forward) i R (ang. reverse), ograniczające nasz badany fragment z obu końców (5' i 3') nici DNA. Następnie, w odpowiednio dobranej temperaturze przyłączania tych starterów prowadzi się od 20-50 cykli powielających badaną sekwencję. Tym sposobem w mieszaninie reakcyjnej w znakomitej większości znajduje się tylko nasz badany fragment DNA. Temperaturę najefektywniejszego przyłączania starterów do matrycy DNA ustala się doświadczalnie, co zostało szczegółowo omówione w kolejnym rozdziale.

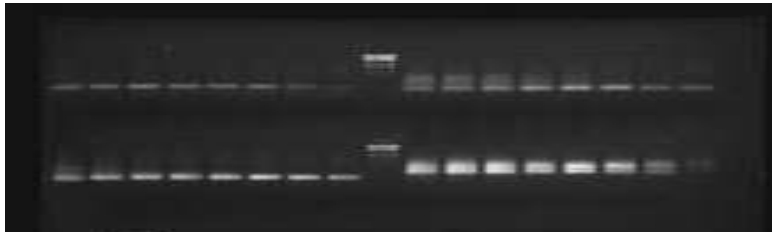
Schemat reakcji PCR przedstawia rycina 13.



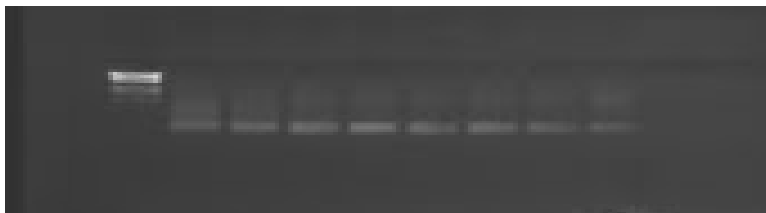
Rycina 13. Schemat reakcji PCR. Opracowanie własne.

5.2.b.1. USTALANIE WARUNKÓW REAKCJI

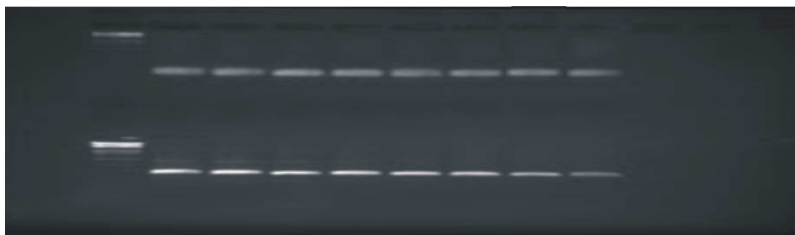
Dla każdego badanego SNP zostały doświadczalnie ustalone parametry reakcji PCR. W tym celu przeprowadzono gradientowy PCR. Reakcja została przeprowadzona z zachowaniem takich samych warunków dla każdej badanej próby przy jedynej zmiennej – temperaturze przyłączania starterów (reakcja została przeprowadzona dla wszystkich prób na tej samej matrycy, z taką samą polimerazą *Taq* i dNTP'ami, w objętości 20ul). Wizualizacja gradientów została przedstawiona na żelach agarozowych w świetle UV (Rysunki 14-18).



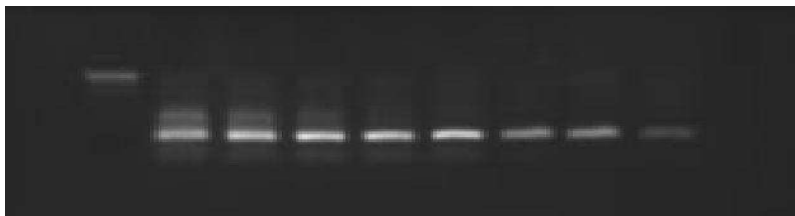
Rycina 14. Gradient PCR. Górny rząd, od lewej: *ATG16L1* rs2241879, marker M (DNA faga lambda trawione enzymami restrykcyjnymi HindIII i EcoRI), *ATG16L1* rs2241880
 Dolny rząd od lewej: *IL23R* rs1004819Marker M, *IL23R* rs7517847
 Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%.



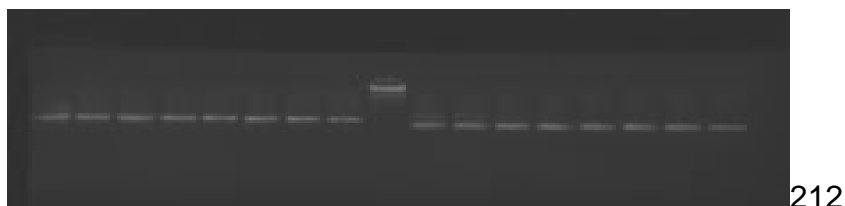
Rycina 15. Gradient PCR. Od lewej: Marker M, gradient dla genu *DLG5* R30Q. Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%



Rycina 16. Gradient PCR. Górny rząd od lewej: marker M, gen *OCTN1* (1672C/T). Dolny rząd od lewej: marker M, gen *TNFalpha* (-857). Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%



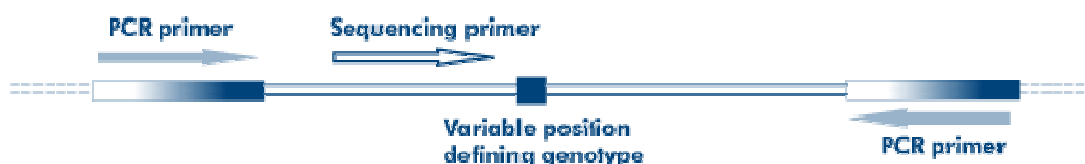
Rycina 17. Gradient PCR. Od lewej: marker M, gen *CARD15/NOD2* G908R
 Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%



Rycina 18. Gradient PCR. Od lewej: gen *TNFalfa* 420, marker M, gen *TNFalfa* 750 G908R Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%.

5.2.b.2. PROJEKTOWANIE STARTERÓW

Do reakcji PCR wymagane jest zaprojektowanie starterów. Ograniczają one badany fragment i umożliwiają jego namnożenie w czasie reakcji. Reakcja pirosekwencjonowania wymaga natomiast dodatkowego startera, tzw. sekwencyjnego. Definiuje on badany SNP poprzez przyłączenie się do produktu reakcji PCR i umożliwia sekwencjonowanie skróconego fragmentu DNA, zawierającego interesującą nas zmianę polimorficzną (Rycina 19). Stratery do analizy SNP zostały zaprojektowane z użyciem oprogramowania dedykowanego do projektowania starterów dla reakcji pirosekwencjonowania.



Rycina 19. Działanie startera sekwencyjnego. Źródło: www.pyrosequencing.com

Tabela 3. Spis starterów użytych do analizy SNP.

Nazwa startera badanego SNP	Sekwencja 5' → 3'	znakowanie	Długość ampliconu (nt)
ATGrS2241879_F	gcttagctgcaggcctagaaa	biotyna	152
ATGrS2241879_R	tggatactcatcctggttctgg		

ATGrS2241879-SEQ	ccacgcttgatattgg		
ATGrS2241880_F	ttacgaagacacacaaggcagtag		98
ATGrS2241880_R	tgtctcttctcccagtc	biotyna	
ATGrS2241880_SEQ	ttaccagaaccaggat		
IL23Rrs7517847_F	cctcttggtttcccattca		292
IL23Rrs7517847_R	tgaatttgagggcctagga	biotyna	
IL23Rrs7517847_SEQ	ttcacctattcecaag		
IL23Rrs1004819_F	tagcagcacaagcattctagga		125
IL23Rrs1004819_R	actgacctgctttatgctgtga	biotyna	
IL23Rrs1004819_SEQ	cttatgagaaatgcagatag		
TNFalfa_-857_F	ggaccccccttaacgaa	biotyna	263
TNFalfa_-857_R	atcacccccgggaattcac		
TNFalfa_-857_SEQ	ctggggcctctaca		
TNFalfa_420_F	taggggggtattttctaggaagtt		216
TNFalfa_420_R	agcgagtccttctcacattgtc	biotyna	
TNFalfa_420_SEQ	tcatcttctgaacc		
TNFalfa_750_F	ggccaagccctgggatga	biotyna	94
TNFalfa_750_R	atagtcgggcccattgatc		
TNFalfa_750_SEQ	gaccctcccagata		
CARD15_908_F	gactctttggccttttcagatt	biotyna	243
CARD15_908_R	ccaatggtcttttcttactcc		
CARD15_908_SEQ	tcgtcaccactctgt		
DLG5_113(R30Q)_F	ttattcccctccacaggcactac		107
DLG5_113(R30Q)_R	gccgcagctgaatggaga	biotyna	
DLG5_113(R30Q)_SEQ	cccctctcactgac		
OCTN1_1672C>T_F	acagaatgctgcctacatcgt	biotyna	92
OCTN1_1672C>T_R	aagagtcattcccaacttcagg		
OCTN1_1672C>T_SEQ	gggaaaaaagggtga		

Tabela 4. Sekwencje analizowane w reakcji pirosekwencjonowania. . W zapisie wykorzystano różne sposoby kodowania sekwencji (patrz: Tabela 5).

L.p.	Nazwa badanego SNP	Sekwencja do analizy (zaznaczono polimorfizm)
1	ATGrS2241879	TRACAGAGCCTGGCAATTAAAGGGTCC

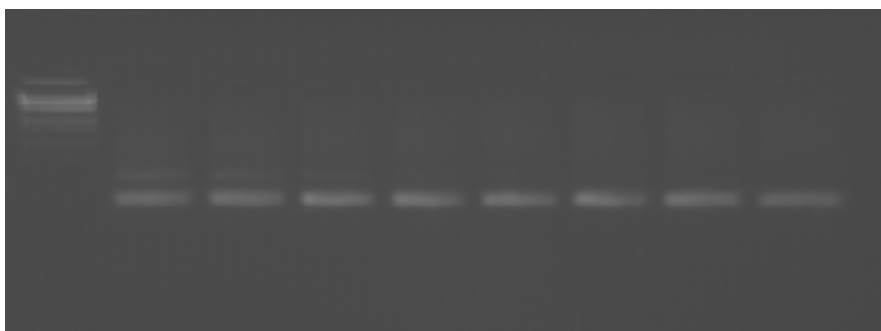
2	ATGrs2241880	GAGYATCCACATTGTCCTGGGGGACTGGG
3	IL23Rrs7517847	GCC K CAGCTACACCTGTATGTAGGCTAGA
4	IL23Rrs1004819	CAYAGTAAGAATCACAGCATAAAGCAGG
5	TNFalfa_-857	TG A /GCCCTGTCTTCGTTAAGGGGGGGTCC
6	TNFalfa_420	C /TGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTT
7	TNFalfa_750	G /TTGGGCTCATACCAGGGCTTGGCCTC
8	CARD15_908	TG C /GCCAGAATCTGAAAAGGCCAAAAGAG
9	DLG5_113(R30Q)	C G /AGCAAGTGAATGAGAAGGTGGAGAAC
10	OCTN1_1672C>T	A /GGATTCCAATCAGGACAGTCAGACTA

Tabela 5. Symbole kodów zmian polimorficznych.

Symbol w sekwencji DNA	Nukleotyd kodowany przez dany symbol
A	A
B	C/G/T
C	C
D	A/G/T
G	G
H	A/C/T
K	G/T
M	A/C
N	A/C/G/T
R	A/G
S	G/C
T	T
V	A/C/G
W	A/T
Y	C/T

5.2.b.3. ANALIZA PRODUKTÓW REAKCJI PCR PRZY ZASTOSOWANIU ELEKTROFOREZY POZIOMEJ W ŻELACH AGAROWYCH

Po każdorazowo przeprowadzonej reakcji PCR przeprowadzano analizę produktów reakcji w żelu agarozowym przy użyciu elektroforezy poziomej. Stężenie żelu agarozowego w zależności od wielkości badanych fragmentów wahało się od 1-1,5%. Do analizy wybierano wyrywkowo kilkanaście prób z całej płytki. Sprawdzenie to miało na celu określenie, czy reakcja PCR zaszła prawidłowo i czy otrzymano pożądaný produkt. Wykluczano jednocześnie zanieczyszczenie próby starterami użytymi do reakcji PCR, produktami niespecyficznymi oraz innymi zanieczyszczeniami, np. strukturami typu „primer-dimer” (struktura dwuniciowa, powstaje samoistnie w wyniku połączenia się częściowo komplementarnych do siebie starterów). Poniżej została przedstawiona przykładowa analiza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR.



Rycina 20. Przykładowe sprawdzenie reakcji PCR na 1,2% żelu agarozowym dla *ATG16L1* rs2241880.

5.2.b.4. SEKWENCJONOWANIE W CZASIE RZECZYWISTYM – PIROSEKWENCJONOWANIE

Pirosekwencjonowanie to stosowana na całym świecie, a ostatnio także w Polsce, metoda badawcza pozwalająca na zdefiniowanie z praktycznie 100%

pewnością sekwencji DNA w krótkim czasie. Reakcja ta nazywana jest także reakcją sekwencjonowania w czasie rzeczywistym.

Choć metoda ta nie należy do najtańszych, to z całą pewnością zakup sprzętu, oprogramowania i wymaganych odczynników zwraca się z nawiązką, jeśli weźmiemy pod uwagę pewność otrzymywanego wyniku i komfort pracy. Daje ona możliwość analizowania jednocześnie 96 zmian polimorficznych w czasie około 20 minut. Wyniki otrzymujemy w postaci pirogramów oraz odczytu komputerowego (wg ustalonych kryteriów program definiuje otrzymany wynik). Eliminowany jest tym samym błąd człowieka, a ponieważ reakcja zachodzi zawsze w takich samych warunkach nie ma także możliwości zakłamania wyniku z powodu czynników zewnętrznych.

Pirosekwencjonowanie to metoda oparta na działaniu enzymów: polimerazy, apyrazy, lucyferazy i sulfurylasy. Produktem wyjściowym dla tej reakcji jest standardowy produkt reakcji PCR, otrzymywany w osobnym etapie (opis reakcji PCR z uwzględnieniem specyficznych warunków dla pirosekwencjonowania opisany został w osobnym rozdziale). Produkt reakcji PCR jest standardowo sprawdzany na żelu agarozowym, celem wyeliminowania błędów, a następnie jest użyty jako matryca do pirosekwencjonowania.

W kolejnym etapie polimeraza w trakcie reakcji PCR dołącza komplementarnie nukleotydy, bazując na matrycy pojedynczej nici wyznakowanej biotyną. Jeżeli dodawany nukleotyd nie znajduje się w sekwencji nici komplementarnej, to jest degradowany przez apyrazę. Jeżeli natomiast znajduje się on w badanej sekwencji, zostaje przyłączony z jednoczesnym uwolnieniem difosforanu (PPi), który w następnym etapie przechodzi w adenozynotryfosforan (ATP) z użyciem sulfurylasy. ATP jest z kolei wykorzystywane przez lucyferazę do reakcji, której efektem jest błysk świetlny odczytywany w końcowej fazie przez komputer. Taki sygnał świetlny jest znakiem, że dodany nukleotyd znalazł się w sekwencji komplementarnej nici DNA i nieć dobudowywana została wydłużona.

Reakcja pirosekwencjonowania zachodzi w jednym etapie, do którego należy jednak przygotować kilka wcześniejszych elementów. Pierwszym z nich jest przygotowanie streptawidyny. Komercyjnie dostępny bufor B miesza się w

odpowiednich proporcjach z wodą i streptawidyną (Tabela 6), aby następnie rozpipetować go do produktu PCR w ilości po 60 ul na dołek.

Tabela 6. Ilości odczynników potrzebne do przygotowania złoża streptawidynowego.

	Ilość na jedną próbkę	Ilość na całą płytkę (96 prób + 4 zapasu)
woda	20	2000
streptawidyna	3	300
Bufor B	37	3700

Równolegle przygotowuje się osobną płaskodenkową płytkę 96-dołkową ze starterem sekwencyjnym przygotowanym w środowisku buforu A (Tabela 7). Do każdego dołka rozpipetowuje się po 40ul mieszaniny, do której w końcowym etapie zostaje uwolniony jednoniciowy produkt PCR.

Tabela 7. Ilości odczynników potrzebne do przygotowania startera sekwencyjnego.

	Ilość na jedną próbkę	Ilość na całą płytkę (96 prób + 4 zapasu)
Starter sekwencyjny	0,32	32
Bufor A	39,68	3968

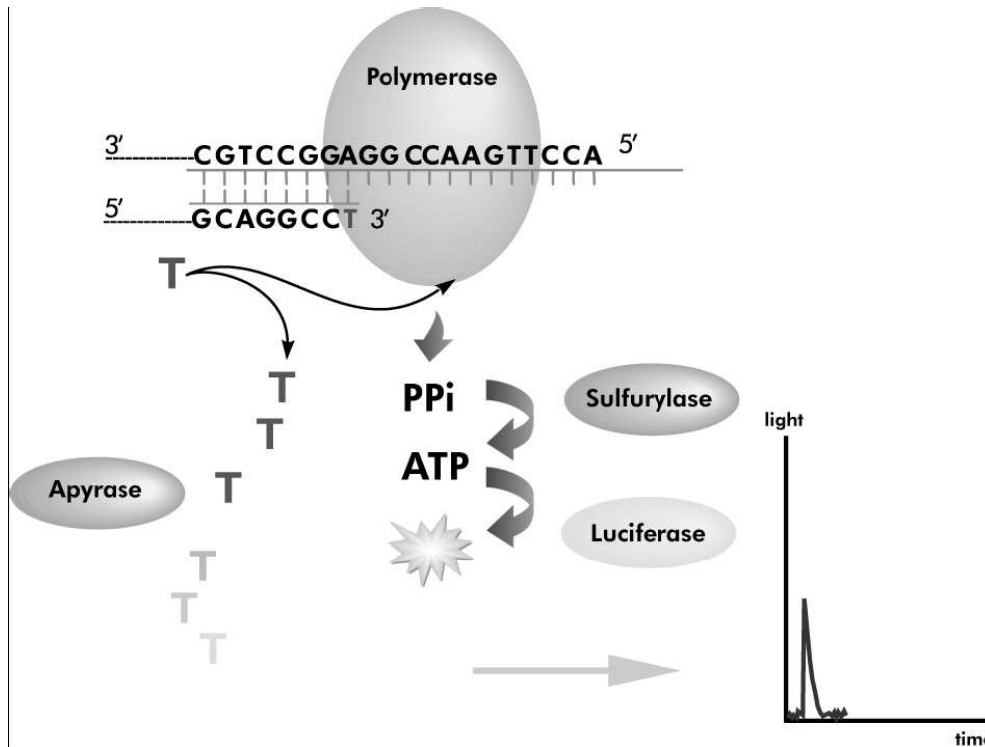
Proces przygotowania reakcji odbywa się w specjalnej stacji z następującymi stanowiskami: stanowisko z alkoholem etylowym (1), stanowisko z roztworem do denaturacji dwuniciowej struktury DNA (2), stanowisko przemywania (3), oraz stanowisko z miliporowaną wodą do przemywania stacji(4), (Rycina 21). W stacji znajduje się także miejsce na płytkę 96-dołkową z produktem PCR (PCR plate), oraz na płaskodenkową płytkę z roztworem startera sekwencyjnego (PSQ plate).



Rycina 21. Poszczególne stanowiska stacji podawczej w kolejnych etapach reakcji pirosekwencjonowania. Źródło: www.pyrosequencing.com

W pierwszym etapie należy zassać produkt PCR z dodaną wcześniej streptawidyną na dyszach 96-igłowej stacji, a następnie przechodząc kolejne etapy zdenaturować produkt, aby otrzymać jednoniciową strukturę DNA z biotyną na jednym końcu sekwencji (biotyna umożliwia zwiążanie DNA z filtrem), a następnie przemyć, aby produkt był wysoce oczyszczony w celu uniknięcia zakłócania sygnału odczytu. Tak przygotowany produkt uwalnia się do startera sekwencyjnego. Płytkę z produktem oraz starterem sekwencyjnym „zapięka się” w temperaturze 80 st. Celsjusza – jest to temperatura przyłączania startera sekwencyjnego do jednoniciowej struktury zdenaturowanego DNA. Następnie płytka ulega wychłodzeniu do temperatury pokojowej i zostaje umieszczona w pirosekwencjonatorze. Kolejny etap polega na automatycznym dodawaniu nukleotydów do każdego dołka reakcyjnego. Jeżeli nukleotyd jest komplementarny do sekwencji jednonicowego DNA to zostaje przyłączony do startera sekwencyjnego, a kamera CCD odczytuje błysk świetlny powstały na drodze reakcji z sulfurylazą i lucyferazą i zapisuje go jako pik w okienku odczytu sekwencji. Jeżeli natomiast nukleotyd nie występuje w sekwencji, to jest on

degradowany poprzez apyrazę, tak, żeby w momencie dodawania kolejnego nukleotydu środowisko reakcji było czyste (Rycina 22).



Rycina 22. Schemat reakcji pirosekwencjonowania. Źródło: www.pyrosequencing.com.

5.2.c. OBJAWY KLINICZNE

5.2.c.1. LOKALIZACJA OBJAWÓW Z PRZEWODU POKARMOWEGO

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC) charakteryzuje się występowaniem objawów na całej długości przewodu pokarmowego, począwszy od jamy ustnej a skończywszy na odbycie. Obraz kliniczny choroby został szczegółowo przedstawiony w początkowych rozdziałach, dlatego nie będzie tutaj ponownie omawiany.

Na potrzeby niniejszej analizy objawy z przewodu pokarmowego zostały podzielone na:

a) objawy z obszaru jamy ustnej, przełyku, żołądka lub dwunastnicy

- b) objawy z obszaru jelita cienkiego
- c) objawy z obszaru jelita grubego
- d) występowanie przetok okołodbytniczych

Objawy kliniczne choroby zlokalizowane w obszarze przewodu pokarmowego zostaną poddane analizie mającej na celu wyłonić ewentualny związek konkretnego allelu/genotypu z objawami klinicznymi w konkretnej lokalizacji. Jeżeli udałoby się określić konkretny allel/genotyp predysponujący do rozwoju choroby w danej, konkretnej lokalizacji, być może w przyszłości udałoby się określić swoisty test prognozujący rozwój choroby.

5.2.c.2. LOKALIZACJA OBJAWÓW WYSTĘPUJĄCYCH POZA PRZEWODEM POKARMOWYM

Poza typowymi objawami z obszaru przewodu pokarmowego, w obrazie klinicznym ChLC u wielu pacjentów obserwuje się występowanie specyficznych objawów spoza układu pokarmowego. Ich występowanie nie jest warunkiem koniecznym do zdiagnozowania choroby, ale w wielu przypadkach są one albo pierwszym objawem choroby, albo objawem towarzyszącym w momencie, kiedy nie można jeszcze postawić rozpoznania choroby.

Są to m. in.:

- a) bóle stawów
- b) zapalenie cewki moczowej
- c) zapalenie tęczówki
- d) *stomatitis aphthosa* – nadżerki w jamie ustnej
- e) rumień guzowaty i zgorzelinowa piodermia
- f) stłuszczenie wątroby
- g) PSC – pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych

h) podwyższona temperatura ciała.

Podobnie jak dla objawów z przewodu pokarmowego, przeprowadzona zostanie szczegółowa analiza mająca na celu określenie konkretnych alleli/genotypów predysponujących do pojawienia się konkretnych objawów chorobowych spoza przewodu pokarmowego. Podobnie jak dla objawów gastrycznych, jeżeli udałoby się określić allel/genotyp predysponujący do rozwoju konkretnych objawów, być może w przyszłości udałoby się określić swoisty test prognozujący rozwój choroby, także w zakresie objawów spoza układu pokarmowego.

6. CEL PRACY

W niniejszej pracy postawiono sobie następujące cele:

1. Przebadać w zakresie 10 zmian polimorficznych (*DLG5* R30Q, *OCTN1* 1672 C/T, *CARD15/NOD2* G908R, *ATG16L1* rs2241879, *ATG16L1* rs2241880, *IL23R* rs7517847, *IL23R* rs1004819, *TNFA* (-857C/T), *TNFA* (420C/T), *TNFA* (720A/T) grupę 160 pacjentów oraz odpowiednią grupę porównawczą w celu określenia układu i częstości występowania poszczególnych alleli i genotypów dla populacji Wielkopolan.
2. Określić taki układ alleli/genotypów, który mógłby być przydatny do **określenia spodziewanej lokalizacji objawów chorobowych i ewentualnych dolegliwości towarzyszących chorobie.**
3. Określić taki układ alleli/genotypów, który mógłby być przydatny do określenia **podatności na konkretne leczenie.**
4. Określić taki układ alleli/genotypów, który mógłby być przydatny do określenia **podatności na zachorowanie.**

Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, nr 1077/07.

7. WYNIKI

7.1. ANALIZA ROZKŁADU GENOTYPÓW I ALLELI

Pierwszy etap badań polegał na określeniu częstości poszczególnych genotypów i alleli dla wybranych do analizy polimorfizmów. Przeprowadzona analiza nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy genotypami poszczególnych polimorfizmów w badanych grupach (Tabela 8).

Tabela 8. Analiza częstości występowania i istotności różnic genotypów pomiędzy grupą populacyjną a pacjentami z chorobą Leśniowskiego – Crohna.

Polimorfizm	Grupa populacyjna		Pacjenci		Test Fishera
	Liczba	Procent	Liczba	Procent	
DLG5_R30Q					
GG	120	81,1	130	87,8	ns
GA	25	16,9	16	10,8	ns
AA	3	2,0	2	1,4	ns
OCTN1_F503L					
AG	71	48,0	90	57,7	ns
GG	61	41,2	51	32,7	ns
AA	16	10,8	15	9,6	ns
CARD15_G908R					
CC	139	93,9	136	91,9	ns
CG	9	6,1	11	7,4	ns
GG	0	0,0	1	0,7	ns
ATGrs2241879					
GA	39	55,7	75	48,7	ns
AA	19	27,1	48	31,2	ns
GG	12	17,1	31	20,1	ns
ATG16L1_Thr300Ala					
TC	46	47,9	74	47,4	ns
CC	22	22,9	48	30,8	ns
TT	28	29,2	34	21,8	ns
IL23Rrs 7517847					
GT	51	53,7	75	48,7	ns
TT	33	34,7	62	40,3	ns
GG	11	11,6	17	11,0	ns
IL23Rrs 1004819					
TT	4	4,3	18	15,9	ns
TC	48	51,1	40	35,4	ns
CC	42	44,7	55	48,7	ns

Ponadto, przeprowadzono analizę w genie TNF-alfa: jedną w obszarze promotorowym (-857) oraz dwóch w obszarze samego genu (420 i 750). Analiza sekwencji w zakresie tych trzech polimorfizmów nie wykazała jednak żadnych zmian, dlatego zostały one wykluczone z dalszej analizy.

Odmienne przedstawia się analiza alleli, gdzie w zakresie polimorfizmu w genie *ATG16L1* Thr300Ala oraz *IL23R* rs2242847 zaobserwowano istotne statystycznie różnice w występowaniu alleli (Tabela 9).

Tabela 9. Analiza częstości występowania i istotności różnic alleli pomiędzy grupą populacyjną a pacjentami z chorobą Leśniowskiego – Crohna.

Polimorfizm	Pacjenci		Grupa populacyjna		Test Fishera
	Liczba	Procent	Liczba	Procent	
DLG5_R30Q					Istotność statystyczna
G	146	89,02	145	88,41	ns
A	18	10,98	28	17,07	ns
OCTN1_F503L					Istotność statystyczna
G	141	57,32	132	57,32	ns
A	105	42,68	87	42,68	ns
CARD15_G908R					Istotność statystyczna
G	12	7,55	9	5,66	ns
C	147	92,45	148	93,08	ns
ATGrs2241879					Istotność statystyczna
G	106	46,29	51	46,29	ns
A	123	53,71	57	53,71	ns
ATG_Thr300Ala					Istotność statystyczna
T	108	46,96	78	33,91	p=0,0775
C	122	53,04	68	29,57	p=0,0017
IL23Rrs 7517847					Istotność statystyczna
T	137	59,83	84	36,68	p=0,0011
G	92	40,17	62	27,07	p=0,0987
IL23Rrs 1004819					Istotność statystyczna
T	58	37,91	52	33,99	ns
C	95	62,09	90	58,82	ns

7.2. ANALIZA ZWIĄZKU POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW Z LOKALIZACJĄ OBJAWÓW Z OBSZARU PRZEWODU POKARMOWEGO

Niniejsze opracowanie zostało przeprowadzone na danych uzyskanych od tych samych pacjentów, którzy wzięli udział w badaniach genetycznych. Niemniej, nie udało się uzyskać wystarczająco wyczerpujących odpowiedzi na temat lokalizacji objawów chorobowych od wszystkich badanych. W takich przypadkach pacjenci ci zostali tylko poddani analizie genetycznej (rozkład genotypów i alleli), natomiast z analizy związków z objawami chorobowymi, podatnością na leczenie oraz występowaniem NChZJ w rodzinie zostali oni wykluczeni.

Analizowano związek genotypów z lokalizacją objawów chorobowych w obszarze jamy ustnej, przełyku, żołądka lub dwunastnicy, jelita cienkiego, jelita grubego oraz z obecnością przetok okołodbytniczych.

Analiza poszczególnych genotypów i ich ewentualnego związku z lokalizacją choroby wykazała, że żaden z genotypów w gronie badanych polimorfizmów, poza *IL23R* rs7517847, nie może być w sposób istotny wiązany z lokalizacją choroby (Tabele 10-15). Tylko *IL23R* rs7517847 może być istotnie wiązany z lokalizacją objawów chorobowych w jelicie cienkim (Tabela 16). Można jednak zauważyć, że częstość występowania genotypu GG w polimorfizmie *DLG5* R30Q była dość wysoka w jelicie cienkim, grubym i przetokach okołodbytniczych i różniła się istotnie statystycznie od częstości genotypów AA oraz GA (Tabela 10).

Tabela 10. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

DLG5 R30Q	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica				jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze			
	GG	AA	GA	Σ	GG	AA	GA	Σ	GG	AA	GA	Σ	GG	AA	GA	Σ
tak	5	0	0	5	42	1	2	45	53	1	7	61	21	1	2	24
nie	73	1	10	84	35	0	8	43	24	0	3	27	57	0	8	65
Ogół	78	1	10	89	77	1	10	88	77	1	10	88	78	1	10	89
Istotność	ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				GGvsAA p<0.0001 GGvsGA p<0.0001				GGvsAAp<0.0001 GGvsGAp<0.0001				GGvsAA p<0.0001 GGvsGA p<0.0001			

Analiza porównawcza par genotypów w obrębie SNP R30Q w genie *DLG5* wykazała, że genotyp GG występuje statystycznie częściej od AA i GA u pacjentów z objawami chorobowymi w jelicie cienkim.

Tabela 11. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

OCTN1 1672C>T	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica				jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze			
	AG	GG	AA	Σ	AG	GG	AA	Σ	AG	GG	AA	Σ	AG	GG	AA	Σ
tak	4	1	0	5	25	19	2	46	33	19	8	60	12	8	3	23
nie	44	31	9	84	23	12	7	42	15	12	1	28	37	23	6	66
Ogół	48	32	9	89	48	31	9	88	48	31	9	88	49	31	9	89
Istotność	ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				AGvsAAp<0.001 GGvsAG p<0.01				AGvsAAp<0.001 GGvsAG p<0.01				ns			

Porównanie par genotypów w genie *OCTN1* w obrębie polimorfizmu 1672C/T wykazało, że genotyp AG wystąpi istotnie częściej od AA, natomiast genotyp GG istotnie częściej od AG wśród pacjentów z jelitową lokalizacją choroby (Tabela 11).

Tabela 12. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

CARD G908R	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica				jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze			
	CC	CG	GG	Σ	CC	CG	GG	Σ	CC	CG	GG	Σ	CC	CG	GG	Σ
tak	4	1	0	5	40	3	0	43	50	6	0	56	22	0	0	22
nie	73	6	0	79	36	4	0	40	26	1	0	27	55	7	0	62
Ogół	77	7	0	84	76	7	0	83	76	7	0	83	77	7	0	84
Istotność	ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				CC vs GG p<0.0001 CC vs CG p<0.001				CC vs GG p<0.0001 CC vs CG p<0.001				CC vs GG p<0.0001 CC vs CG p<0.001			

Analiza porównawcza par genotypów wykazała, że genotyp CC wystąpi istotnie częściej zarówno od genotypu GG jak i CG wśród pacjentów dotkniętych objawami chorobowymi w jelicie cienkim, grubym i przetokach okołodbytniczych.

Tabela 13. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

ATG rs2241 879	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica				jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze			
	GA	AA	GG	Σ	GA	AA	GG	Σ	GA	AA	GG	Σ	GA	AA	GG	Σ
tak	1	1	2	4	22	16	8	46	33	16	10	59	16	3	5	24
nie	43	25	16	84	22	9	10	41	11	9	8	28	29	22	13	64
Ogół	44	26	18	88	44	25	18	87	44	25	18	87	45	25	18	88
Istotność	ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				GA vs GG p=0.005				GA vs GG p=0.005				ns			

Analiza porównawcza par genotypów wykazała, że w obrębie genu *ATG rs2241879* genotyp GA wystąpi istotnie częściej od GG u pacjentów z lokalizacją objawów chorobowych w jelicie cienkim i jelicie grubym.

Tabela 14. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

ATG rs2241 880	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica				jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze			
	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ
tak	2	2	1	5	23	15	9	47	35	15	11	61	14	4	6	24
nie	44	24	18	86	23	10	10	43	11	10	8	29	33	21	13	67
Ogół	46	26	19	91	46	25	19	90	46	25	19	90	47	25	19	91
Istotność	ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				TCvsTTp=0.005				TCvsTTp=0.005				ns			

Analiza porównawcza genotypów w zakresie genu *ATG16L1 rs2241880* wykazała, że genotyp TC wystąpi statystycznie częściej od TT wśród pacjentów z jelitową lokalizacją choroby.

Tabela 15. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

IL23R rs1004 819	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze						
	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ		
tak	1	1	1	3	3	17	20	40	8	22	25	55	2	9	11	22		
nie	10	32	35	77	8	15	16	39	3	10	11	24	9	23	25	57		
Ogół	11	33	36	80	11	32	36	79	11	32	36	79	11	32	36	79		
Istotność	ns				ns					ns					ns			
Porównanie par genotypów	ns				TTvsCCp=0.005					TTvsTCp=0.005 TTvsCCp=0.005					ns			

Analiza porównawcza par genotypów w genie IL23R rs1004819 wykazała, że genotyp TT jest istotnie bardziej związany z lokalizacją choroby w jelicie cienkim i jelicie grubym od genotypu CC oraz od genotypu TC w jelicie grubym.

Tabela 16. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

IL23Rrs 7517847	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie				jelito grube				przetoki okołodbytnicze						
	TT	GT	GG	Σ	TT	GT	GG	Σ	TT	GT	GG	Σ	TT	GT	GG	Σ		
tak	1	2	0	3	23	15	7	45	24	28	7	59	11	9	3	23		
nie	36	37	11	84	14	23	4	41	13	10	4	27	26	30	8	64		
Ogół	37	39	11	87	37	38	11	86	37	38	11	86	37	39	11	87		
Istotność	ns				p=0.0364					ns					ns			
Porównanie par genotypów	ns				TTvsGGp<0.0001					TTvsGGp<0.0001 GTvsGGp<0.0001					ns			

Według analizy statystycznej polimorfizm rs7517847 w genie *IL23R* jako jedyny z wybranych do niniejszego badania może być wiązany z lokalizacją choroby w jelicie cienkim. Porównanie par genotypów wykazało ponadto, że genotyp TT wystąpi u pacjentów częściej od GG. W jelicie grubym najczęściej występują genotypy GT oraz TT i częstość ich występowania jest istotnie wyższa od genotypu GG.

7.3. ANALIZA ZWIĄZKU POSZCZEGÓLNYCH ALLELI Z LOKALIZACJĄ OBJAWÓW Z OBSZARU PRZEWODU POKARMOWEGO

Dla każdego z badanych polimorfizmów została przeprowadzona analiza rozkładu alleli oraz ich powiązania z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym. Wyniki zostały przedstawione w tabelach 17-23. Żaden z alleli nie okazał się jednak istotnie związany z lokalizacją objawów chorobowych w przewodzie pokarmowym. Niemniej, analiza porównawcza alleli wykazała pewne różnice, które zostały przedstawione w poszczególnych tabelach.

Tabela 17. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem
DLG5_R30Q												
tak	5	0	5	44	3	47	60	8	68	23	2	25
nie	83	11	94	43	8	51	27	3	30	65	8	73
Ogół	88	11	99	87	11	98	87	11	98	88	10	98
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porównanie alleli	ns			G vs A p<0.001			G vs A p<0.001			G vs A p<0.01		

Allel G wystąpi istotnie częściej u pacjentów z lokalizacją choroby w jelicie cienkim, grubym, lub u tych, którzy będą mieli przetoki okołodbytnicze.

Tabela 18. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem
OCTN1 1672C>T												
tak	5	4	9	44	27	71	52	41	93	20	15	35
nie	75	53	128	35	30	65	27	16	43	60	43	103
Ogół	80	57	137	79	57	136	79	57	136	80	58	138
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porównanie alleli	ns			G vs A p<0.025			G vs A p<0.02			ns		

Allel G będzie istotnie częstszy u pacjentów z lokalizacją jelitową choroby.

Tabela 19. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	G	C	Razem	G	C	Razem	G	C	Razem	G	C	Razem
CARD15 _908												
tak	1	5	6	3	43	46	6	56	62	0	22	22
nie	6	79	85	4	40	44	1	27	28	7	62	69
Ogół	7	84	91	7	83	90	7	83	90	7	84	91
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porównanie alleli	ns			C vs G p<0.001			C vs G p<0.001			C vs G p<0.001		

W obrębie polimorfizmu G908R w genie CARD15/NOD2 allel C będzie istotnie częstszy u pacjentów z lokalizacją jelitową choroby, oraz u tych, którzy rozwiną przetoki okołodbytnicze.

Tabela 20. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem	G	A	Razem
ATGrS 2241879												
tak	3	2	5	30	38	68	43	49	92	21	19	40
nie	59	68	127	32	31	63	19	20	39	42	51	93
Ogół	62	70	132	62	69	131	62	69	131	63	70	133
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porównanie alleli	ns			ns			ns			ns		

Tabela 21. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	T	C	Razem	T	C	Razem	T	C	Razem	T	C	Razem
ATGrS 2241880												
tak	3	4	7	32	38	70	46	50	96	20	18	38
nie	62	68	130	33	33	66	19	21	40	46	54	100
Ogół	65	72	137	65	71	136	65	71	136	66	72	138
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porównanie alleli	ns			ns			ns			ns		

Tabela 22. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	T	G	Razem	T	G	Razem	T	G	Razem	T	G	Razem
IL23Rrs 7517847												
tak	3	2	5	38	22	60	52	35	87	20	12	32
nie	73	48	121	37	27	64	23	14	37	56	38	94
Ogół	76	50	126	75	49	124	75	49	124	76	50	126
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porówn. alleli	ns			ns			T vs G p<0.02			ns		

Allel T wystąpi istotnie częściej od allelu G u pacjentów z objawami chorobowymi w jelicie grubym.

Tabela 23. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

	Jama ustna, przełyk, żołądek lub dwunastnica			jelito cienkie			jelito grube			przetoki okołodbytnicze		
	T	C	Razem	T	C	Razem	T	C	Razem	T	C	Razem
IL23Rrs 1004819												
tak	2	2	4	20	37	57	30	47	77	11	20	31
nie	42	67	109	23	31	54	13	21	34	32	48	80
Ogół	44	69	113	43	68	111	43	68	111	43	68	111
Istotność	ns			ns			ns			ns		
Porówn. alleli	ns			ns			C vs T p<0.04			ns		

Allel C wystąpi istotnie częściej od allelu T u pacjentów z objawami chorobowymi w jelicie grubym.

7.4 ANALIZA ZWIĄZKU GENOTYPÓW Z OBJAWAMI SPOZA PRZEWODU POKARMOWEGO

W niniejszej pracy zostały także przeanalizowane związki poszczególnych genotypów z lokalizacją objawów chorobowych obserwowanych poza przewodem pokarmowym. Analizowano związek genotypów z bólami stawów, zapaleniem cewki moczowej, zapaleniem tęczęwki, *stomatitis aphatosa*, rumieniem guzowatym, stłuszczeniem wątroby czy podwyższoną ciepłotą ciała. Wyniki analizy zostały przedstawione w tabelach 24-37.

Tabela 24. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	bóle stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczęwki				stomatitis aphatosa				rumień guzowaty			
	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ
DLG5_R30Q	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ
tak	48	1	4	53	11	0	1	12	10	0	0	10	22	0	3	25	18	0	3	21
nie	29	0	6	35	65	1	9	75	66	1	10	77	54	1	7	62	58	1	7	66
Ogół	77	1	10	88	76	1	10	87	76	1	10	87	76	1	10	87	76	1	10	87
Istotność	ns				ns				ns				ns							
Porówn. par genotypów	GGvsAA p<0.001 GGvsGA p<0.001				GGvsAA p<0.001 GGvsGA p<0.001				GGvsAA p<0.001 GGvsGA p<0.001				GGvsAA p<0.001 GGvsGA p<0.001							

Analiza porównawcza genotypów wykazała istotnie częstsze występowanie genotypu GG we wszystkich analizowanych przypadkach.

Tabela 25. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	stłuszczenie wątroby				gorączka			
	GG	AA	GA	Razem	GG	AA	GA	Razem
DLG5 R30Q	GG	AA	GA	Razem	GG	AA	GA	Razem
tak	4	0	1	5	38	0	6	44
nie	72	1	9	82	38	1	4	43
Ogół	76	1	10	87	76	1	10	87
Istotność	ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				GGvsAA p<0.0001 GGvsGA p<0.0001			

Analiza porównawcza genotypów wykazała, że genotyp GG wystąpi istotnie częściej od AA i GA u pacjentów z podwyższoną ciepłotą ciała. Zależność ta wydaje się jednak nie być ściśle związana z objawami typowymi dla ChLC a raczej z ogólną niedyspozycją organizmu, np. z rozwojem stanu zapalnego. Była to jednak cecha deklarowana przez pacjentów jako jeden z objawów, które u siebie zaobserwowali, stąd została ona tutaj uwzględniona.

Tabela 26. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	ból stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphthosa				rumień guzowaty			
	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ
OCTN1 1672 C>T	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ	A	G	A	Σ
tak	26	21	6	53	7	4	0	11	3	6	0	9	14	8	2	24	10	7	2	19
nie	22	10	3	35	41	26	9	76	45	24	9	78	34	22	7	63	38	23	7	68
Ogół	48	31	9	88	48	30	9	87	48	30	9	87	48	30	9	87	48	30	9	87
Istotność	ns				ns				ns				ns							
Porównanie par genotypów	AGvsAA p<0.001 GGvsAA p<0.001				ns				ns				AGvsAAp<0.02 AGvsAAp<0.02							

Analiza porównawcza par genotypów wykazała, że wśród pacjentów deklarujących ból stawów genotypy AG i GG wystąpią istotnie częściej od AA, natomiast *stomatitis aphthosa* i rumień guzowaty wystąpi częściej u tych pacjentów, którzy wykażą genotyp AG niż u tych z genotypem AA.

Tabela 27. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	stłuszczenie wątroby				gorączka			
	AG	GG	AA	Razem	AG	GG	AA	Razem
OCTN1 1672 C>T	AG	GG	AA	Razem	AG	GG	AA	Razem
tak	2	2	0	4	25	15	3	43
nie	46	28	9	83	23	15	6	44

Ogół	48	30	9	87	48	30	9	87
Istotność	ns				ns			
Porównanie par genotypów					AGvsAA p<0.0001 GGvsAA p<0.001			

Dla polimorfizmu 1672C/T w genie *OCTN1* wykazano również pewne zależności odnośnie podwyższonej temperatury ciała: genotyp AG i GG wystąpi istotnie częściej od AA, ale podobnie jak w poprzednim przypadku, wydaje się to być raczej związane z wystąpieniem stanu zapalnego i nie można traktować tego objawu jako specyficznego dla ChLC.

Tabela 28. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	bóle stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphatosa				rumień guzowaty			
	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ
CARD G908R	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ	C	C	G	Σ
tak	45	5	0	50	10	2	0	12	8	1	0	9	22	2	0	24	15	4	0	19
nie	31	2	0	33	65	5	0	70	67	6	0	73	53	5	0	58	60	3	0	63
Ogół	76	7	0	83	75	7	0	82	75	7	0	82	75	7	0	82	75	7	0	82
Istotność	ns				ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	CCvsCG p<0.001 CCvsGG p<0.001				CCvsCG p<0.03				ns				CCvsGG p<0.01 CCvsCG p<0.01				CCvsGG p<0.03			

Analiza porównawcza par genotypów wykazała, że genotyp CC jest istotnie częstszy od pozostałych odnośnie wykazanych objawów spoza przewodu pokarmowego.

Tabela 29. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	stłuszczenie wątroby				gorączka			
	CC	CG	GG	Razem	CC	CG	GG	Razem
CARD15 G908R	CC	CG	GG	Razem	CC	CG	GG	Razem
tak	4	1	0	5	35	6	0	41
nie	71	6	0	77	40	1	0	41

Ogół	75	7	0	82	75	7	0	82
Istotność	ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				CCvsCG p<0.001 CCvsGG p<0.0001			

Analiza porównawcza par genotypów w zakresie genu *CARD15/NOD2* wykazała, że genotyp CC wystąpi częściej od CG i GG u pacjentów z gorączką.

Tabela 30. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	ból stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphthosa				rumień guzowaty			
	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ	G	A	G	Σ
ATG rs2241879	A	A	G	Σ	A	A	G	Σ	A	A	G	Σ	A	A	G	Σ	A	A	G	Σ
tak	25	15	12	52	9	1	2	12	6	1	3	10	13	5	5	23	11	5	3	19
nie	20	10	5	35	35	24	15	74	38	24	14	76	31	20	12	63	33	20	14	67
Ogół	45	25	17	87	44	25	17	86	44	25	17	86	44	25	17	86	44	25	17	86
Istotność	ns				ns				ns				ns							
Porównanie par genotypów	GAvsAAp<0.01 GAvsGGp<0.01				ns				ns				ns				GAvsGG p<0.02			

Analiza statystyczna porównująca pary genotypów wykazała, że genotyp GA wystąpi istotnie częściej od pozostałych w przypadku zadeklarowania przez chorych bólu stawów i rumienia guzowatego.

Tabela 31. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	ból stawów				stłuszczenie wątroby				gorączka			
	GA	AA	GG	Razem	GA	AA	GG	Razem	GA	AA	GG	Razem
ATG rs2241879	GA	AA	GG	Razem	GA	AA	GG	Razem	GA	AA	GG	Razem
tak	3	0	2	5	22	14	6	42	22	14	6	42
nie	41	25	15	81	22	11	11	44	22	11	11	44
Ogół	44	25	17	86	44	25	17	86	44	25	17	86
Istotność	ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				ns				GAvsGG p<0.001			

Analiza porównawcza wykazała, że genotyp GA wystąpi istotnie częściej od GG w odniesieniu do gorączki u pacjentów z ChLC.

Tabela 32. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

ATG rs2241880	ból stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphatosa				rumień guzowaty			
	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ	TC	CC	TT	Σ
tak	27	15	12	54	8	1	3	12	5	1	4	10	13	6	6	25	12	5	4	21
nie	20	10	6	36	38	24	15	77	41	24	14	79	33	19	12	64	34	20	14	68
Ogół	47	25	18	90	46	25	18	89	46	25	18	89	46	25	18	89	46	25	18	89
Istotność	ns				ns				ns				ns				ns			
Porównanie par genotypów	TCvsTT p<0.01				ns				ns				ns				TCvsTT p<0.04			

Analiza statystyczna wykazała istotnie częstszą obecność genotypu TC u pacjentów, u których wystąpił rumień guzowaty lub ból stawów.

Tabela 33. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

ATG rs2241880	stłuszczenie wątroby				gorączka			
	TC	CC	TT	Razem	TC	CC	TT	Razem
tak	3	0	2	5	22	14	8	44
nie	43	25	16	84	24	11	10	45
Ogół	46	25	18	89	46	25	18	89
Istotność	ns				ns			
Porównanie par genotypów	ns				TCvsTT p<0.01			

Genotyp TC wystąpił istotnie częściej od TT wśród pacjentów z gorączką.

Tabela 34. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	ból stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphthosa				rumień guzowaty			
	T	G	G	Σ	T	G	G	Σ	T	G	G	Σ	T	G	G	Σ	T	G	G	Σ
IL23R rs7517847	T	G	G		T	G	G		T	G	G		T	G	G		T	G	G	
tak	24	21	8	53	7	3	2	12	4	5	1	10	10	10	4	24	6	8	5	19
nie	12	18	3	33	28	36	9	73	31	34	10	75	25	29	7	61	29	31	6	66
Ogół	36	39	11	86	35	39	11	85	35	39	11	85	35	39	11	85	35	39	11	85
Istotność	ns				ns				ns				ns							
Porównanie par genotypów	TTvsGG p<0.01 GTvsGGp<0.01				ns				ns				ns							

Analiza genotypów w genie *IL23R* rs 7517847 wykazała, że u pacjentów, u których wystąpiły bóle stawów genotyp TT wystąpi istotnie częściej od GG, natomiast genotyp GT istotnie częściej od GG.

Tabela 35. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

ból stawów	stłuszczenie wątroby				gorączka				
	TT	GT	GG	Razem	TT	GT	GG	Razem	
IL23R rs7517847									
tak		2	3	0	5	22	14	5	41
nie	33		36	11	80	13	25	6	44
Ogół	35	39	11	85	35	39	11	85	
Istotność	ns				ns				
Porównanie par genotypów	ns				TTvsGG p<0.03 GTvsGG p<0.01				

Analizując pary genotypów ponownie wykazano pewne zależności związane z objawem podwyższonej ciepłoty ciała, ale podobnie jak w poprzednich przypadkach nie wydają się one być związane specyficznie z ChLC.

Tabela 36. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	ból stawów				zapalenie cewki moczowej				zapalenie tęczy				stomatitis aphthosa				rumień guzowaty			
	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ	TT	TC	CC	Σ
IL23R rs1004 819																				
tak	8	19	19	46	3	3	6	12	2	4	3	9	5	7	11	23	2	4	13	19
nie	3	13	17	33	8	29	30	67	9	28	33	70	6	25	25	56	9	28	23	60
Ogół	11	32	36	79	11	32	36	79	11	32	36	79	11	32	36	79	11	32	36	79
Istotność	ns				ns				ns				ns							
Porównanie par genotypów	ns				ns				ns				ns				TTvsCC p<0.03 TCvsCC p<0.03			

Analiza par genotypów wykazała, że pacjenci z rumieniem guzowatym istotnie częściej posiadają genotyp TT od CC, oraz TC od CC.

Tabela 37. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

	stłuszczenie wątroby				gorączka			
	TT	TC	CC	Razem	TT	TC	CC	Razem
IL23R rs1004819								
tak	2	2	1	5	8	11	18	37
nie	9	30	35	74	3	21	18	42
Ogół	11	32	36	79	11	32	36	79
Istotność	ns				P=0.078			
Porównanie par genotypów	ns				CCvsTT p<0.03			

Analiza par genotypów w genie *IL23R* rs 1004819 wykazała zależność między genotypem CC a podwyższoną temperaturą ciała.

7.5 ANALIZA ZWIĄZKU POSZCZEGÓLNYCH ALLELI Z LOKALIZACJĄ OBJAWÓW SPOZA PRZEWODU POKARMOWEGO

Poddano analizie związek alleli w badanych polimorfizmach z lokalizacją objawów spoza rury przewodu pokarmowego. Nie wykazano jednak związków żadnego z alleli z symptomami chorobowymi z badanej grupy objawów spoza przewodu pokarmowego. Dla niektórych polimorfizmów zaobserwowano jednak pewne tendencje w odniesieniu do danej lokalizacji objawów (*DLG5R30Q*, *CARD15G908R*). Wyniki przedstawiono w tabeli 38.

Tabela 38. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym oraz porównanie alleli w odniesieniu do konkretnej lokalizacji objawów.

	ból stawów		zapalenie cewki moczowej		zapalenie tęczęwki		stomatitis aphatosa		rumień guzowaty		stłuszczenie wątroby		gorączka	
	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A
DLG5R30Q														
nie	35	6	74	10	76	11	61	8	65	8	81	10	42	5
tak	52	5	12	1	10	0	25	3	21	3	5	1	44	6
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	G vs A p<0.01		ns		ns		ns		G vs A p<0.001		ns		G vs A p<0.001	
OCTN1_1672C>T														
nie	32	25	67	50	69	54	56	41	61	45	74	55	38	29
tak	47	32	11	7	9	3	22	16	17	12	4	2	40	28
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
CARD15G908R														
nie	33	2	70	5	73	6	58	5	63	3	77	6	58	5
tak	50	5	12	0	9	1	24	2	19	4	5	1	24	2
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	C vs G p<0.001		ns		ns		ns		ns		ns		C vs G p<0.01	
ATGrs2241879														
tak	40	37	59	40	62	52	51	43	53	47	66	56	33	33
nie	30	25	10	11	7	9	18	18	16	14	3	5	36	28
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
ATGrs2241880														
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C

tak	39	42	53	62	55	65	55	52	48	54	59	68	34	35
nie	26	30	11	9	9	6	19	19	16	17	5	3	30	36
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
IL23R rs7517847	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G
tak	45	29	64	45	65	44	54	36	60	37	69	47	38	31
nie	40	21	10	5	9	6	20	14	14	13	5	3	36	19
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	T vs G p<0.04		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
IL23R rs1004819	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
tak	27	38	37	59	37	61	31	50	37	51	39	65	24	39
nie	16	30	6	9	6	7	12	18	6	17	4	3	19	29
istotność	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Porówn. alleli	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	

7.6 ANALIZA ZWIĄZKU GENOTYPÓW I ALLELI Z LECZENIEM

Analizie poddano związek genotypów i alleli prezentowanych przez pacjentów z zastosowanym u nich leczeniem. Leki, które podawano pacjentom podzielono następująco:

- sulfasalazyna
- mesalazyna
- metylprednizolon
- tiopuryny
- somatostatyna
- anty-TNF
- ciprofloksacyna
- metronidazol.

W zakresie każdego badanego polimorfizmu szukano związków genotypów i alleli z każdym lekiem z wyżej wymienionej grupy. Z racji ogromu analiz, przedstawione zostaną tylko te, które okazały się istotne statystycznie.

I tak, nie znaleziono żadnych związków (zarówno w aspekcie analizy genotypów jak i alleli) pomiędzy leczeniem a polimorfizmami *DLG5* R30Q, *OCTN1* 1672 C>T, *CARD15/NOD2* G908R, *IL23R* rs7517847 oraz *IL23R* rs1004819.

Odnotowano natomiast statystycznie istotną zależność pomiędzy genem *ATG16L1* a leczeniem metylprednizolonem, co oznacza, że taki układ genotypów nie jest przypadkowy. Znotowano istotne różnice dla obu badanych polimorfizmów w obrębie tego genu – rs2241879 oraz rs2241880 (Tabela 39 i 40).

Tabela 39. Rozkład genotypów dla *ATG16L1* rs2241879 a leczeniem metylprednizolonem.

ATG16L1 rs2241879	Metylprednizolon		
	tak	nie	Razem
GA	19	23	42
AA	12	11	23
GG	2	15	17
Ogół	33	49	82
Istotność	P=0,0232		

Tabela 40. Rozkład genotypów dla *ATG16L1* rs2241880 a leczeniem metylprednizolonem.

ATGr2241880	Metylprednizolon		
	tak	nie	Razem
TC	21	23	44
CC	11	12	23
TT	2	16	18
Ogół	34	51	85
Istotność	p=0,0189		

7.7 ANALIZA ZWIĄZKU GENOTYPÓW I ALLELI ZE WSPÓLISTNIEJĄCYMI W RODZINIE CHOROBIAMI

Tematem zainteresowania było także, czy którykolwiek z polimorfizmów odnotowanych wśród pacjentów dotkniętych chorobą Leśniowskiego – Crohna ma związek z innymi chorobami przewodu pokarmowego wśród innych członków rodzin (wrzodziejące zapalenie jelita grubego, ChLC, nowotwory jelita grubego lub gruźlica).

Statystycznie istotny okazał się związek pomiędzy polimorfizmem w genie *CARD15/NOD2* G908R a występowaniem w rodzinie nowotworów jelita grubego (za „tak” przyjęto, gdy przynajmniej jeden członek z najbliższej rodziny miał zdiagnozowany nowotwór jelita grubego; matka, ojciec, brat, siostra, syn lub córka). Wyniki ilustruje tabela 41.

Tabela 41. Związek *CARD15/NOD2* G908R z występowaniem nowotworów jelita grubego w rodzinie.

CARD15_908	Nowotwory jelita grubego		Razem
	nie	tak	
C	61	6	67
G	3	3	6
Ogół	64	9	73
Istotność	p=0,021		

Innych zależności nie wykazano.

8.WNIOSKI

PODSUMOWANIE

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadanych zostało 160 pacjentów z ChLC w zakresie 10 zmian polimorficznych. Wyniki zostały porównane do odpowiednio dobranej grupy populacyjnej. Na podstawie przeprowadzonych analiz wyciągnięto następujące wnioski:

1. Określono rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmów:

- a. *DLG5* R30Q,
- b. *OCTN1* 1672 C/T,
- c. *CARD15/NOD2* G908R,
- d. *ATG16L1* rs2241879,
- e. *ATG16L1* rs2241880,
- f. *IL23R* rs7517847,
- g. *IL23R* rs1004819,
- h. *TNFA* (-857C/T),
- i. *TNFA* (420C/T),
- j. *TNFA* (720A/T)

Prawie wszystkie polimorfizmy wykazywały zmienność wykazaną szczegółowo w poprzednich rozdziałach niniejszej pracy. Jedynie wybrane polimorfizmy w genie *TNFA* (podpunkty h, i, j) nie wykazały żadnej zmienności i dlatego zostały one wykluczone z dalszej analizy.

Nie udało się określić znaczących różnic pomiędzy rozkładem poszczególnych genotypów pomiędzy grupą badaną a grupą populacyjną.

Analizując rozkład alleli wykazano znaczące statystycznie różnice pomiędzy:

- częstością występowania poszczególnych alleli dla genu *ATG16L1* (rs2241880) – allel C był istotnie częstszy w grupie chorych ($p=0.0017$, dla allelu T $p=0.0775$)

- częstością występowania poszczególnych alleli dla genu *IL23R* (rs7517847) – allel T był istotnie częstszy w grupie chorych ($p=0.0011$, dla allelu G $p=0.0987$)

Wskazane allele (C dla *ATG16L1* Thr300Ala(rs2241880) oraz T dla genu *IL23R* rs7517847) mogą wiązać się z podwyższonym ryzykiem zachorowania.

2. Analiza genotypów i alleli dla poszczególnych polimorfizmów wykazała, że **istnieją pewne tendencje, które mogą określać predyspozycje do rozwinięcia choroby o określonej lokalizacji, jak również do zaistnienia objawów spoza przewodu pokarmowego**. I tak:

- w genie *DLG5* istotnie częściej u pacjentów z lokalizacją objawów w jelicie cienkim wystąpi genotyp GG; również analiza alleli wykazała, że allel G jest istotnie częstszy u pacjentów z manifestacją jelitową choroby oraz u tych, którzy mają przetoki okołodbytnicze. Genotyp GG był także istotnie częstszy u pacjentów z objawami spoza przewodu pokarmowego (ból stawów, zapalenie cewki moczowej, zapalenie tęczówki, *stomatitis aphatosa*, rumień guzowaty, stłuszczenie wątroby, gorączka). Allel G wykazywał takie same tendencje, z wyjątkiem związku ze stłuszczeniem wątroby.

- w genie *OCTN1* istotnie najczęściej występowały genotypy AG i GG u pacjentów z objawami w jelicie cienkim oraz grubym. Analiza alleli wykazała, że allel G jest także istotnie częstszy u pacjentów z taką lokalizacją choroby. Objawy spoza przewodu pokarmowego takie jak ból stawów, *stomatitis aphatosa*, rumień guzowaty czy gorączka, również były związane z istotnie częstszą obecnością genotypu AG.

- w genie *CARD15/NOD2* istotnie najczęstszy był genotyp CC oraz allel C i wiązał się istotnie z objawami jelitowymi choroby oraz wystąpieniem przetok okołodbytniczych. Podobne tendencje wykazano podczas analizy objawów spoza przewodu pokarmowego: u pacjentów z bólem stawów, zapaleniem cewki moczowej, *stomatitis aphatosa*, rumieniem guzowatym lub gorączką obserwowano istotnie częściej genotyp CC oraz allel C.

- w genie *ATG16L1* rs2241879 istotnie częstszy był genotyp GA u pacjentów z objawami w obszarze jelita cienkiego; wiązał się on ponadto z bólami stawów i

rumieniem guzowatym. Analiza alleli nie wykazała dla tego polimorfizmu istotnych zależności.

- w genie *ATG16L1* dla rs2241880 istotnie częstszy był genotyp TC dla lokalizacji objawów w jelicie cienkim, jak również był on związany z obecnością bóli stawów lub rumienia guzowatego. Analiza alleli nie wykazała istotnych zależności.

- w genie *IL23R* rs1004819 zaobserwowano istotnie częściej genotyp TT u pacjentów z lokalizacją objawów w jelicie cienkim, ale już analiza alleli wskazuje na to, że obecność samego allelu T może wiązać się istotnie z objawami także w jelicie grubym. Ponadto, genotypy TT i TC wykazane zostały także istotnie częściej u pacjentów deklarujących rumień guzowaty jako jeden z towarzyszących im objawów.

- w genie *IL23R* rs7517847 genotyp TT występuje istotnie częściej u pacjentów z objawami w jelicie cienkim. Razem z genotypem GT jest on też istotnie częstszy dla bóli stawów.

3. Jedynym genem, który w wyniku niniejszej analizy wykazywał związek z leczeniem był gen *ATG16L1*. W zakresie obu badanych polimorfizmów (rs2241879 oraz rs2241880) wykazano, że uzyskany układ genotypów nie jest przypadkowy i ma istotny statystycznie związek z leczeniem pacjentów z ChLC metylprednizolonem. Niestety, uzyskane informacje nie uwzględniają wyczerpujących danych na temat steroidozależności lub –oporności, nie wiemy też jak długo pacjenci stosowali ten typ leczenia i czy we wszystkich przypadkach wykazywał on jednakową skuteczność. Ten aspekt badań wymaga szerszej analizy skupionej głównie na danych klinicznych odnośnie przebiegu leczenia. Zależności wykazane w niniejszym projekcie doktorskim mogą być tylko traktowane jako swoisty zwiastun, **wymagający jednak dalszej, szczegółowej analizy.**

4. Pomimo, iż przebadanie aż 10 polimorficznych miejsc genomu w sześciu genach w grupie 160 pacjentów nie dało istotnych statystycznie wyników, **udało się zaobserwować pewne tendencje, które mogą stanowić swoistą pomoc przy prowadzeniu pacjenta. Nie mogą one jednak być stosowane jako wiarygodny element diagnozy, a raczej jako swoista predyspozycja do rozwoju choroby u pacjenta.** Nadal jednak podstawowym źródłem stawianej diagnozy pozostaje

badanie przedmiotowe, podmiotowe oraz badania kolonoskopowe, histopatologiczne oraz badania obrazowe.

WNIOSKI KOŃCOWE

- 1. Wszystkie polimorfizmy, z wyjątkiem tych w genie *TNFalfa*, wykazywały zmienność w populacji Wielkopolan.**
- 2. Nie udało się określić znaczących różnic pomiędzy rozkładem poszczególnych genotypów pomiędzy grupą badaną a grupą populacyjną. Analizując rozkład alleli wykazano znaczące statystycznie różnice w polimorfizmach *ATG16L1* (rs2241880) oraz *IL23R* (rs7517847).**
- 3. Istnieją pewne tendencje, które mogą określać predyspozycje do rozwinięcia choroby o określonej lokalizacji, jak również do zaistnienia objawów spoza przewodu pokarmowego (na podstawie analizy porównawczej par genotypów i alleli).**
- 4. Jedynym genem, który w wyniku niniejszej analizy wykazywał związek z leczeniem metylprednizolonem był gen *ATG16L1*, wynik ten wymaga jednak dalszej szczegółowej analizy.**
- 5. Chociaż udało się zaobserwować pewne tendencje, które mogą stanowić swoistą pomoc przy prowadzeniu pacjenta, nie mogą one jednak być stosowane jako wiarygodny element diagnozy, a raczej jako swoista predyspozycja do rozwoju choroby u pacjenta i pomoc w prowadzeniu chorego przez lekarza.**

9.DYSKUSJA

Choroba Leśniowskiego – Crohna (ChLC) znana jest lekarzom od dziesięcioleci. Już w 1904 roku Antoni Leśniowski próbował scharakteryzować chorobę, a w późniejszych latach jego wysiłki powieliło także wielu innych badaczy. Niestety, jak do tej pory o ChLC wiadomo niewiele. Znane są liczne opisy przypadków klinicznych, różnych lokalizacji symptomów chorobowych, opisy objawów zlokalizowanych zarówno w obszarze przewodu pokarmowego jak i objawów towarzyszących chorobie, typowych dla ChLC ale niekoniecznie związanych z rurą przewodu pokarmowego. Od drugiej połowy XX wieku wiadomo także, że ChLC jest również warunkowana przez czynniki genetyczne. Nie działają one jednak niezależnie, a raczej razem z czynnikami immunologicznymi i środowiskowymi dają wypadkową w postaci choroby. Wszystkie te informacje rzucają coraz więcej światła na etiologię nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ), a w tym ChLC, ale nie rozwiązują jednak całkowicie zagadki tej złożonej choroby.

Badania genetyczne zapoczątkowane odkryciem regionu IBD1, a później położonym w jego obrębie genu *CARD15/NOD2* wydawały się znaleźć odpowiedź na nurtujące naukowców pytania: co jest przyczyną choroby? co wzmacnia ryzyko zachorowania, a co jest czynnikiem ochronnym? dlaczego obraz kliniczny choroby jest tak złożony i zróżnicowany i od czego on zależy? czy i w jaki sposób choroba ta się dziedziczy? Szybko okazało się jednak, że to, co wydawało się dawać ostateczną odpowiedź i rozwiewać wszystkie wątpliwości otworzyło raczej nowe perspektywy na ustalenie przyczyn ChLC, ale nadal nie rozwiązało problemu. Dziś uważa się ChLC za chorobę poligeniczną, co oznacza, że u jej podłoża leżą wielogenowe, skomplikowane zależności. Jeszcze do niedawna mówiło się o grupie około 40 genów zaangażowanych w ChLC, ale najnowsze doniesienia mówią o nawet dwukrotnie większej liczbie *locus* biorących udział w warunkowaniu tej choroby.

W trakcie projektowania niniejszej pracy doktorskiej pojawił się pomysł zbadania rozkładu genotypów w licznych miejscach ludzkiego genomu wśród pacjentów z Wielkopolski ze zdiagnozowaną chorobą Leśniowskiego-Crohna. Jak zostało opisane we wcześniejszych rozdziałach, pomimo podobnego przebiegu klinicznego, badania czynników genetycznych leżących u podłoża ChLC różnią się w

zależności od populacji, z której wywodzi się pacjent. Ponieważ dla populacji polskiej takie zależności w niniejszym czasie nie zostały jeszcze zbadane, postanowiono zdefiniować rozkład genotypów i alleli dla naszej populacji. Co więcej, dysponując także informacją o przebiegu klinicznym choroby, postanowiono zbadać, czy istnieją zależności pomiędzy konkretnym genotypem a przebiegiem choroby, lokalizacją objawów chorobowych czy podatnością na konkretne leczenie.

W ostatnim czasie pojawiły się pewne doniesienia na temat związku lokalizacji objawów chorobowych z konkretnymi genotypami. Najnowsze doniesienia z 2010 roku (Jurgens i wsp., 2010) opisujące badania prowadzone przez niemieckich badaczy na pacjentach ze zdiagnozowaną ChLC wskazały, że istnieje wyraźna zależność pomiędzy obecnością homozygotycznych mutacji w genie *CARD15/NOD2* a pojawianiem się przetok i współistniejących przewężeń pozapalnych w jelicie. W ramach badań wchodzących w zakres niniejszej pracy doktorskiej przebadano jedną zmianę typu SNP (G908R) w genie *CARD15/NOD2* i w naszych badaniach nie wykazała ona istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli w grupie chorych w odniesieniu do zdrowej populacji. Zaobserwowano jednak pewne tendencje wiążące genotyp CC z istotnie częstszą jego obecnością u pacjentów z lokalizacją jelitową choroby (zarówno jelito cienkie, jak i grube). Nasze badania potwierdziły także związek z tendencjami do tworzenia się przetok okołodbytnicznych u pacjentów z obecnością genotypu CC i pozostają w tej kwestii w zgodzie z niemieckimi badaniami. Co więcej, w naszych badaniach wskazano także na pewne tendencje do pojawiania się specyficznych objawów chorobowych, które nie są związane z przewodem pokarmowym, takich jak bóle stawów, zapalenie tęczówki, rumień guzowaty czy *stomatitis aphatosa* (zwiększona tendencja zachorowania dla genotypu CC). Ten aspekt badań wydaje się ciekawie uzupełniać dotychczasowe doniesienia, ponieważ nie został poruszony w niemieckiej publikacji i ma w związku z tym charakter nowatorski.

W pracy doktorskiej przeanalizowano także dwie zmiany polimorficzne leżące w genie *IL23R* (IL23Rrs7517847 oraz IL23Rrs1004819) i dla pierwszej z nich zaobserwowano istotne statystycznie różnice w częstości występowania alleli w porównaniu z grupą populacyjną (allel T $p=0,0011$, allel G $p=0,0987$). Wskazuje to, że polimorfizm IL23Rrs7517847 może być w istotny sposób związany z

podwyższonym ryzykiem zachorowania. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wskazują także, że genotyp TT w obrębie polimorfizmu IL23R rs1004819 może być wskaźnikiem tendencji do rozwijania zmian chorobowych w obrębie jelita cienkiego i grubego. Podobnie dla IL23Rrs7517847, genotyp TT był tam istotnie częstszy u pacjentów ze zmianami jelitowymi, a genotyp TG również wykazywał tendencję rozwoju choroby, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w obrębie jelita grubego. Nasze badania nie wskazują jednak żadnego istotnego związku genu *IL23R* z pojawieniem się przetok, co pozostaje w zgodzie z wynikami zaprezentowanymi w przytaczanej powyżej niemieckiej publikacji.

Kolejnym doniesieniem na temat związku genu *CARD15/NOD2* z przebiegiem choroby jest praca z 2006 roku przeprowadzona na grupie chorwackiej (Cukovic-Cavka i wsp., 2006). Donosi ona, iż mutacje w genie *CARD15/NOD2* są związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ChLC, a także odpowiadają za wcześniejsze rozpoznanie choroby (wcześniejszy wiek postawienia diagnozy) oraz potrzebę interwencji chirurgicznej (cięższy przebieg choroby). W ramach badań przeprowadzonych na chorwackich pacjentach analizowano trzy najczęstsze mutacje/polimorfizmy występujące w genie *CARD15/NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC).

Pracą pozostającą w zgodzie z przytoczonym powyżej doniesieniem jest praca Annese i wsp. (2005), dowodząca że posiadanie chociaż jednej z kluczowych mutacji/polimorfizmów jest odpowiedzialne za agresywny przebieg choroby. Być może dlatego, że w niniejszym projekcie doktorskim zaplanowano analizę tylko jednego z wymienionych polimorfizmów – Gly908Arg – nie wykazano podobnej zależności. Według danych literaturowych, największy udział w zwiększaniu ryzyka zachorowania oraz ciężkości przebiegu ma mutacja insercyjna, która nie była w ramach tego doktoratu badana. Nie znaczy to jednak, że nasi pacjenci nie będą mieli wykonanej tej analizy – zostanie ona przeprowadzona, nie jest jednak elementem niniejszego opracowania.

Inną pracą, która pojawiła się w 2007 roku była praca prezentująca badanie związku przebiegu choroby, jej fenotypu z obecnością NChZJ w wywiadzie rodzinnym (Henriksen i wsp., 2007). W przytoczonym badaniu nie wykazano wpływu

występowania NChZJ w wywiadzie rodzinnym na fenotyp choroby, ani też nie był on czynnikiem prognostycznym jej przebiegu. Tematem zainteresowania w ramach badań przeprowadzonych w ramach niniejszego doktoratu również był aspekt występowania rodzinnego NChZJ, ale także innych schorzeń, jak np. nowotworów jelita grubego. Postanowiono odnieść choroby występujące w rodzinie chorego do noszonego przez danego pacjenta genotypu. Wykazano, że gen *CARD15/NOD2* wykazywał istotny statystycznie związek z występowaniem wśród członków rodziny chorego na ChLC nowotworów jelita grubego ($p=0,021$). Wynik ten jest pewnego rodzaju zwiastunem ewentualnych zależności i wymaga szerszej analizy, niemniej wskazuje na to, że rodziny chorych są narażone na podwyższone ryzyko zachorowania na inne choroby przewodu pokarmowego. Aspekt nowotworzenia w NChZJ był wielokrotnie podnoszony w literaturze tematu i wydaje się, że niniejszy wynik wpisuje się w teorię nowotworzenia w NChZJ.

Publikacja zaprezentowana w 2004 roku, (Newman i wsp., 2004) podnosiła problem istnienia związku pomiędzy wariantami allelicznymi kodującymi układ HLA oraz genem *CARD15/NOD2* a ChLC. Przytoczone badania potwierdziły, że zarówno gen *CARD15/NOD2* jak i wariant HLA DRB1 są związane ze wzrostem ryzyka rozwoju objawów chorobowych w obszarze jelitowym pacjenta, jak również mają one związek ze wzrostem ryzyka zachorowania na ChLC. Ponadto, wykazano, że allel HLA-DRB1*0103 wykazuje związek z późniejszym rozpoznaniem i zdiagnozowaniem choroby. W tym miejscu warto zauważyć, że układ HLA jest jednym z najbardziej polimorficznych układów w genomie człowieka i jako taki, stanowi wręcz doskonały marker cech z nim powiązanych. Wydaje się, że pomimo, iż niniejszym projekcie nie analizowano aspektu HLA w odniesieniu do ChLC, może warto w przyszłości poszerzyć badania o analizę jego wariantów.

Kolejną pracą, która potwierdziła związek genu *CARD15/NOD2* z objawami klinicznymi choroby była publikacja Mendoza i wsp. z 2003 badająca zależności w populacji hiszpańskiej. Praca ta jest o tyle ciekawa, że wskazuje nie tylko na wpływ obecności trzech głównych zmian SNP w genie *CARD15/NOD2* na pojawienie się objawów chorobowych w obrębie jelitowym, ale także dowodzi, że nosiciele mutacji G908R wykazują postać choroby przebiegającą ze zwężeniami jelit oraz zwiększony udział interwencji chirurgicznych, włącznie z appendektomią. O ile badania

przeprowadzone w ramach prezentowanej pracy doktorskiej potwierdzają hiszpańskie doniesienia o związku mutacji G908R z lokalizującą jelitową chorobą, to pozostałe aspekty nie zostały w niniejszym projekcie przeanalizowane i uzyskane przez Mendozę i wsp. rezultaty nie mogą być tutaj porównane z wynikami dla populacji polskiej. Potrzeba częstszych interwencji chirurgicznych związanych z obecnością mutacji w genie CARD15/NOD2 została także potwierdzona w zeszłym roku (2010) kiedy poddano analizie pediatryczne przypadki z ChLC (Lacher i wsp., 2010). Okazało się, że poniżej 17. roku życia interwencje chirurgiczne były częstsze wśród tych dzieci, które wykazały obecność mutacji.

Zupełnie odmiennym tematem badań, który również został poruszony w ramach analiz przeprowadzanych do niniejszego doktoratu był aspekt podatności na leczenie w zależności od posiadanego genotypu. Pragnę zauważyć, że temat ten jest bardzo rozległy i wymaga odrębnego opracowania (które jest obecnie również prowadzone w ramach grantu KBN wykonywanego w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, zespół Prof. dr hab. Ryszarda Słomskiego, podatność na leczenie lekami tiopurynowymi). Nie chciałabym zostawić wrażenia pobieżnego tylko przeanalizowania tej tematyki, niemniej z danych klinicznych uzyskanych od pacjentów wynika ewidentnie pewna zależność. Zaobserwowano związek polimorfizmu w genie *ATG16L1* rs2241880 z leczeniem metylprednizolonem. Ponieważ był to wynik niejako „poboczny”, który nie był głównym tematem zainteresowania w niniejszym opracowaniu, postanowiono go przytoczyć, jako być może cenną wskazówkę w dalszych opracowaniach, niemniej zdecydowano nie skupiać się na nim w prezentowanej analizie. Z podobnym wynikiem nie spotkałam się w innych opracowaniach, dlatego przed zaprezentowaniem jednoznacznych wniosków wydaje się wskazane poszerzenie badań w tym zakresie. Znane są pewne związki pomiędzy układem genotypów a podatnością na leczenie lekami tiopurynowymi, nie można zatem wykluczyć, że podobne zależności mogą występować w odniesieniu do innych grup leków, w tym właśnie wymienionych tiopuryn. Temat ten wydaj mi się ciekawy i wart dalszej wnikliwej analizy, którą być może uda się zrealizować w innym projekcie badawczym.

Ciekawe doniesienie naukowe pojawiło się w 2008 roku, kiedy to Barrett i wsp. wykonali analizę GWAS (ang. genome-wide association studies) na grupie 3230

pacjentów z ChLC oraz 4829 osobach należących do grupy porównawczej (badania GWAS polegają na poddaniu analizie ogromnej liczby polimorfizmów w grupie badanej, czyli grupie pacjentów, a następnie przebadaniu w zakresie tych samych zmian grupy kontrolnej/ populacyjnej; różnice w występowaniu zmian polimorficznych w obu tych grupach (wykazane zazwyczaj dzięki bardzo wnikliwej analizie statystycznej) wskazują na ewentualne związki polimorfizmów z badaną chorobą). Badania te wykazały, że w genomie człowieka znajdują się przynajmniej 32 geny związane z podatnością na zachorowanie na ChLC (11 loci wykazanych we wcześniejszych doniesieniach zostało potwierdzonych, oraz zidentyfikowano 21 nowych miejsc w ludzkim genomie). Pozostaje to w zgodzie z obecnie panującym przekonaniem, że w warunkowanie ChLC zaangażowanych jest około 30-35 różnych genów.

Podobne badania przeprowadzono w zeszłym roku (McGovern i wsp., 2010) kiedy to dzięki analizie GWAS przeprowadzonej na grupie 2693 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz 6791 osobach w grupie porównawczej wykazano udział 30 loci w warunkowaniu choroby (14 potwierdzonych dla wcześniejszych doniesień).

Badania GWAS stosowano także w aspekcie poszukiwań miejsc w genomie człowieka związanych z podatnością na leczenie lekami biologicznymi (Dubinsky i wsp., 2010). Poddano analizie grupę pediatryczną ze zdiagnozowaną NChZJ analizując ją w kontekście indywidualizacji reakcji nietolerancji na terapię lekami z grupy *anty-TNFalfa*. W tym kontekście uzyskane w niniejszym projekcie doktorskim wyniki odnośnie związku genu *ATG16L1* z podatnością na leczenie metylprednizolonem wydają się ciekawym zwiastunem zależności farmakogenetycznych.

Przedstawione powyżej doniesienia wskazują ewidentnie na to, że na świecie od lat obserwuje się tendencje do badań typu *multilocus*, do poszukiwania nie jednej mutacji czy polimorfizmu warunkującego chorobę, ale złożonych zależności międzygenowych. Tym samym ta praca doktorska chociaż w niewielkim stopniu stara się dorównać światowym trendom. Oczywiście, zdaję sobie sprawę, że tak niewielka w porównaniu z badaniami światowymi, grupa pacjentów nie jest konkurencyjna dla

przedstawionych wyżej doniesień, ale niestety z powodów ograniczeń finansowych poszerzenie jej nie było możliwe.

Nie wszystkie polimorfizmy badane w niniejszej pracy doktorskiej były wcześniej analizowane w odniesieniu do przebiegu klinicznego choroby. W Polsce badania takie są raczej nowatorskie, chociaż na arenie światowej były już prezentowane. Najczęściej analizie poddany zostaje nadal gen *CARD15/NOD2*, który wydaje się mieć jak dotąd największy związek z ChLC. Z biegiem lat pojawiają się jednak kolejne doniesienia o kolejnych genach podatności, które rzucają nowe światło na otrzymane dotychczas wyniki, jak np *ATG16L1* czy *IL23R*. W tej pracy doktorskiej postanowiono poddać analizie te geny, które na przestrzeni ostatnich lat były najczęściej wiązane z ChLC. Część zaplanowanych badań była zupełnie nowatorska, inne skupiały się na przebadaniu kwestii znanych dla innych populacji, ale nie badanych wcześniej wśród polskich pacjentów. Planując prezentowane tutaj badania postanowiono skupić się na analizie jak największej ilości genów oraz polimorfizmów, tak, aby ewentualnie uchwycić zależności między genami. Udało się zaobserwować pewne tendencje w występowaniu symptomów chorobowych w odniesieniu do konkretnego genotypu, nie znaleziono jednak zależności, które mogłyby okazać się kluczowe w wyjaśnieniu zagadki ChLC. Być może powodem jest ich brak, lub też zbyt mała grupa badana. Choć grupa 160 pacjentów wydaje się dość pokaźna, to na świecie podobne analizy przeprowadza się na grupach kilkutyśnicowych. Niestety, w polskich warunkach finansowania nauki tak duża analiza jest niezwykle problematyczna i za sukces można uznać analizę chociaż 160 pacjentów, ale w 10 miejscach polimorficznych.

W momencie rozpoczynania badań temat analizy typu multilocus w odniesieniu do objawów klinicznych choroby i jej przebiegu był na polskim rynku naukowym nowatorski, a co więcej, nawet na arenie światowej doniesień na ten temat było stosunkowo niewiele. W ostatnich latach jednak zaobserwowano pewne zainteresowanie tematem na świecie, w Polsce jednak opracowanie genetyczne typu multilocus powiązane z analizą objawów klinicznych w tak szerokim spektrum było nadal swoistą nowością. Nie bez znaczenia pozostaje tutaj fakt, iż badania zostały przeprowadzone na światowej klasy sprzęcie, do niedawna jedynym w Polsce pirosekwenatorze. Warto także zaznaczyć, że chociaż nadal nie poznano istotnych

zależności genetycznych leżących u podłoża ChLC, nie oznacza to, że nie jest to możliwe w przyszłości. Na świecie trwają analizy zmierzające do ustalenia przyczyn choroby i wydaje się, że w miarę możliwości także badacze w Polsce będą próbowali odnaleźć się w tym nurcie. Choroba Leśniowskiego-Crohna jest przecież chorobą bardzo złożoną, a niniejszy projekt badawczy pokrywa tylko pewną część hipotez.

10. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY

Poniżej zostały zamieszczone podstawowe skróty używane w pracy:

IBD – ang. inflammatory bowel disease, nieswoiste choroby zapalne jelit

NChZJ - nieswoiste choroby zapalne jelit

CU – ang. colitis ulcerosa, wrzodziejące zapalenie jelita grubego

WZJG - wrzodziejące zapalenie jelita grubego

CD – ang. Crohn's disease

ChLC – choroba Leśniowskiego – Crohna

PSC – ang. primary sclerosing cholangitis, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych

PCR – ang. polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy

dNTP – deoksynukleozydotrifosforan

dATP - deoksyadenozynotrifosforan

dCTP - deoksyctozynotrifosforan

dGTP - deoksyguanidynotrifosforan

dTTP – deoksytymidynotrifosforan

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

IL – interleukina

TBE – bufor TBE (TRIS, kwas borowy, EDTA)

11. WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH ODCZYNNIKÓW, ENZYMÓW, SPRZĘTU ORAZ BUFORÓW UŻYTYCH W ANALIZACH

Chemikalia:

- o Agaroza (Sigma)
- o Akrylamid (Sigma)
- o Bisakrylamid (Sigma)
- o Ammonium persulphate - APS (Sigma)
- o N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine - TEMED (Sigma)
- o Glicerol (Sigma)
- o Ethylenediaminetetracetic acid - EDTA (Sigma)
- o Trizma base - TRIS (Sigma)
- o Guanidine izothiocyanate (Sigma)
- o Formamid (Amersham)
- o Etanol (Polmos Poznań)
- o Fenol (POCh Gliwice)
- o Chloroform (POCh Gliwice)
- o Kwas borowy (POCh Gliwice)
- o AgNO₃ (POCh Gliwice)
- o Na₂CO₃, (POCh Gliwice)
- o HCHO (POCh Gliwice)
- o dNTP (Sigma)
- o GTC pH 7,0

4 M guanidine izothiocyanate

25 mM sodium citrate

0.5% sarkosyl

0.1% 2-merkaptoetanol

Enzymy:

- o Polimeraza Taq 5 U/ μ l (Sigma)
- o Polimeraza Finnzyme

Bufory:

- o Bufor używany do izolacji DNA

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.1 mM EDTA

pH 7.4

- o 10x TBE (1 litr)

TRIS (105 g)

kwasy borowe (55 g)

EDTA (5.8 g)

pH 7.8

- o bufory używane do pirosekwencjonowania

Binding

Annealing

Sprzęt:

- o Spektrofotometr (Pharmacia Biotech)
- o Pirosekwencjator PSQ96
- o Wirówka RT6000B (Sorvall)
- o Mikrowirówka 5714 R (Eppendorf)
- o Termocykler gradientowy (Biometra)
- o System do elektroforezy poziomej z zasilaczem
- o System wizualizacji żeli agarozowych

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Częstość występowania i epidemiologia NChZJ wg źródła: habilitacja Prof. UM dr hab. Agnieszka Dobrowolska-Zachwieja / w USA (na 100 000 osób) wg Yamada, 2006.

Tabela 2. Regiony IBD w genomie człowieka (Źródło: baza NCBI - opracowanie własne).

Tabela 3. Spis starerów użytych do analizy SNP.

Tabela 4. Sekwencje analizowane w reakcji pirosekwencjonowania. . W zapisie wykorzystano różne sposoby kodowania sekwencji (patrz: Tabela 5).

Tabela 5. Symbole kodów zmian polimorficznych.

Tabela 6. Ilości odczynników potrzebne do przygotowania złoza streptawidynowego.

Tabela 7. Ilości odczynników potrzebne do przygotowania startera sekwencyjnego.

Tabela 8. Analiza częstości występowania i istotności różnic genotypów pomiędzy grupą populacyjną a pacjentami z chorobą Leśniowskiego – Crohna.

Tabela 9. Analiza częstości występowania i istotności różnic alleli pomiędzy grupą populacyjną a pacjentami z chorobą Leśniowskiego – Crohna.

Tabela 10. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 11. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 12. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 13. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 14. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 15. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 16. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 17. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 18. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 19. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 20. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 21. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 22. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 23. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów w przewodzie pokarmowym.

Tabela 24. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 25. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 26. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 27. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 28. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 29. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 30. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 31. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 32. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 33. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 34. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 35. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 36. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 37. Analiza genotypów i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym.

Tabela 38. Analiza alleli i ich związku z lokalizacją objawów poza przewodem pokarmowym oraz porównanie alleli w odniesieniu do konkretnej lokalizacji objawów.

Tabela 39. Rozkład genotypów dla *ATG16L1* rs2241879 a leczeniem metylprednizolonem.

Tabela 40. Rozkład genotypów dla *ATG16L1* rs2241880 a leczeniem metylprednizolonem. Tabela

Tabela 41. Związek *CARD15/NOD2* G908R z występowaniem nowotworów jelita grubego w rodzinie.

13.SPIS RYCIN

Rycina 1. Choroba Leśniowskiego-Crohna – obraz radiologiczny choroby: charakterystyczne zwężenia jelita, prowadzące do niedrożności.

Rycina 2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego – obraz radiologiczny choroby: charakterystyczna tzw. „sztywna rura” przewodu pokarmowego, stan jelita po długotrwałym procesie zapalnym.

Rycina 3. Charakterystyczny obraz jelita w chorobie Leśniowskiego – Crohna: zdrowa tkanka poprzeplatana jest tkanką zmienioną chorobowo (po resekcji). Źródło: <http://images.google.pl>

Rycina 4. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Źródło: <http://images.google.pl>.

Rycina 5. Choroba Leśniowskiego-Crohna. Źródło: <http://images.google.pl>.

Rycina 6. Wiek rozpoznania NChZJ /100,000 osób. Źródło: Am J Gastroenterol, 2006, Blackwell Publishing /www.medscape.com/

Rycina 7. Budowa genu *CARD15/NOD2* oraz białka NOD2. Zaznaczono dwa najczęstsze polimorfizmy (w tym badany Gly908Arg) i jedną mutację występującą najczęściej w odniesieniu do ChLC. Opracowanie własne.

Rycina 8. Budowa genu i białka DLG5. Zaznaczono badany polimorfizm. Opracowanie własne.

Rycina 9. Budowa genu *ATG16L1*. Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

Rycina 10. Budowa genu *IL23R*. Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

Rycina 11. Budowa genu *OCTN1*. Zaznaczono badany polimorfizm (1672C/T, L503F). Opracowanie własne.

Rycina 12. Budowa genu *TNFalfa*. Zaznaczono badane polimorfizmy. Opracowanie własne.

Rycina 13. Schemat reakcji PCR. Opracowanie własne.

Rycina 14. Gradient PCR. Górny rząddek, od lewej: *ATG16L1* rs2241879, marker M (DNA faga lambda trawione enzymami restrykcyjnymi HindIII i EcoRI), *ATG16L1* rs2241880

Środkowy rząddek od lewej: *IL23R* rs1004819Marker M, *IL23R* rs7517847

Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%.

Rycina 15. Gradient PCR. Od lewej: Marker M, gradient dla genu *DLG5* R30Q.

Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%

Rycina 16. Gradient PCR. Górny rząddek od lewej: marker M, gen *OCTN1* (1672C/T).

Dolny rząddek od lewej: marker M, gen *TNFalfa* (-857). Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%

Rycina 17. Gradient PCR. Od lewej: marker M, gen *CARD15/NOD2* G908R

Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%

Rycina 18. Gradient PCR. Od lewej: gen *TNFalfa* 420, marker M, gen *TNFalfa* 750

G908R Temp. od lewej: 48,9; 52,0; 54,4; 56,8; 59,1; 61,5; 63,9; 66,1 st. Celsjusza. Żel agarozowy 1,2%.

Rycina 19. Działanie starera sekwencyjnego. Źródło: www.pyrosequencing.com

Rycina 20. Przykładowe sprawdzenie reakcji PCR na 1,2% żelu agarozowym.

Rycina 21. Poszczególne stanowiska stacji podawczej w kolejnych etapach reakcji pirosekwencjonowania. Źródło: www.pyrosequencing.com

Rycina 22. Schemat reakcji pirosekwencjonowania. Źródło: www.pyrosequencing.com.

14 BIBLIOGRAFIA

1. Aberle J, Evans D, Beil FU, Seedorf U. A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight-loss after short-term diet. *Clin Genet.* 2005;68(2):152-4
2. Anderle P, Farmer P, Berger A, Roberts MA: Nutrigenomic approach to understanding the mechanisms by which dietary long-chain fatty acids induce gene signals and control mechanisms involved in carcinogenesis. *Nutrition* 2004 Jan;20(1):103-8
3. Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Incà R, Ardizzone S, Riegler G, Giaccari S, Vecchi M, Castiglione F, Gionchetti P, Cocchiara E, Vigneri S, Latiano A, Palmieri O, Andriulli A. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol.* 2005 Jan;100(1):84-92
4. Arme DK, Mack DR, Morgan K, Izrael D, Lambrette P, Costea I, Krupoves A, Figury H, Dong J, G, Rimard G, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease" *Aliment Pharmacol Ther* 2009: 1025-103
5. Baptista ML., Amarante H., Picheth G., Sdepanian VL., Peterson N., Babasukumar U., Lima HC., Kugathasan S. CARD15 and IL23R influence Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis* 2008 May; 15(5): 674-9
6. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Ragueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorri J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly

- MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Aug;40(8):955-62
7. Cadwell K., Patel KK., Komatsu M., Virgin HW 4th, Stappenbeck TS. A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth Cells and Crohns disease. *Autophagy*, 2009 Feb 8; 5(2)
 8. Cadwell K, Liu JY, Brown S L, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008, 456: 259-263,
 9. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 80: 273-390
 10. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD, Lanchbury J, Barker JN, Trembath RC, Nestle F. O. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum. Genet.* 2007, 122: 201-206
 11. Cukovic-Cavka S, Likic R, Francetic I, Rustemovic N, Opacic M, Vucelic B Lactobacillus acidophilus as a cause of liver abscess in NO2/CARD15 – positive patient with Crohn's disease. *Digestion* 2006, 73, 107-110
 12. Cukovic-Cavka S, Vermeire S, Hrstic I, Claessens G, Kolacek S, Jakic-Razumovic J, Krznaric Z, Grubelic K, Radic D, Misak Z, Jadresin O, Rutgeerts P, Vucelic B. NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006 Aug;18(8):895-9.
 13. Cummings SA, Rubin DT. The complexity and challenges of genetic counselling and testing for inflammatory bowel disease. *Journal of Genetic Counselling* 2006, 15(6)

14. Cho J. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol* 2008 January 21; 14(3):338-347
15. Cho J, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2007; 133:1327-1339
16. Deram S, Villares S. Genetic variants influencing effectiveness of weight loss strategies. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53/2
17. Dubinsky MC, Mei L, Friedman M, Dhere T, Haritunians T, Hakonarson H, Kim C, Glessner J, Targan SR, McGovern DP, Taylor KD, Rotter JI. Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNFalpha therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Aug;16(8):1357-66.
18. Duerr, RH. Genetics of inflammatory bowel disease. *Inflam. Bowel Dis.* 1996, 2: 48-60,
19. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, and 11 others. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006, 314: 1461-1463
20. Duerr RH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 2002, 3, 63-76
21. Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulcier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M. Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;20(12):1051-4
22. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, and 11 others. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE* 2: e819, 2007. Note: Electronic Article
23. Grant SF, Baldassano RN, Hakonarson H. Classification of genetic profiles of Crohn's disease: a focus on the ATG16L1 gene. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008 Mar; 8(2): 199-207

24. Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, vol. 73, 205-211
25. McGovern DP, van Heel DA, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP. Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. *Am. J. Hum. Genet.* vol. 73, 1465-1466, 2003
26. McGovern DP, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, Neale BM, Ong RT, Lagacé C, Li C, Green T, Stevens CR, Beauchamp C, Fleshner PR, Carlson M, D'Amato M, Halfvarson J, Hibberd ML, Lördal M, Padyukov L, Andriulli A, Colombo E, Latiano A, Palmieri O, Bernard EJ, Deslandres C, Hommes DW, de Jong DJ, Stokkers PC, Weersma RK; NIDDK IBD Genetics Consortium, Sharma Y, Silverberg MS, Cho JH, Wu J, Roeder K, Brant SR, Schumm LP, Duerr RH, Dubinsky MC, Glazer NL, Haritunians T, Ippoliti A, Melmed GY, Siscovick DS, Vasiliauskas EA, Targan SR, Annese V, Wijmenga C, Pettersson S, Rotter JI, Xavier RJ, Daly MJ, Rioux JD, Seielstad M. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4):332-7.
27. van Heel DA, Dechairo BM, Dawson G, McGovern DP, Negoro K, Carey AH, Cardon LR, Mackay I, Jewell DP, Lench NJ. The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. *Hum. Molec. Genet.* vol. 12 2003
28. Heilbronn LK, Noakes M, Morris AM, Kind KL, Clifton PM. "360His polymorphism of the apolipoprotein A-IV gene and plasma lipid response to energy restricted diets in overweight subjects". *Atherosclerosis.* 2000;150(1):187-92
29. Magne Henriksen , Jurgen Jahnsen , Idar Lygren , Morten H Vatn & Bjorn Moum. Are There Any Differences in Phenotype or Disease Course Between Familial and Sporadic Cases of Inflammatory Bowel Disease; Results of a Population-Based Follow-Up Study. *The American Journal of Gastroenterology* 2007, 102, 1955–1963
30. Hugh J. Freedman „Familial Crohn's Disease in Single or Multiple First-Degree Relatives" *J Clin Gastroenterol*,2002, 35(1):9-13

31. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823, 1996. PubMed ID : 8587604
32. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y and 8 others : Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603, 2001. PubMed ID : 1138557
33. Jürgens M, Brand S, Laubender RP, Seiderer J, Glas J, Wetzke M, Wagner J, Pfennig S, Tillack C, Beigel F, Weidinger M, Schnitzler F, Kreis ME, Göke B, Lohse P, Herrmann K, Ochsenkühn T. The presence of fistulas and NOD2 homozygosity strongly predict intestinal stenosis in Crohn's disease independent of the IL23R genotype. *J Gastroenterol.* 2010 Jul;45(7):721-31 Epub 2010 Apr 29.
34. Karban A, Eliakim R, Brant SR. Genetics of Inflammatory bowel disease. *IMAJ* 2002; 4:798-802
35. Kirsner JB, Spencer JA. Family occurrences of ulcerative colitis, regional enteritis, and ileocolitis. *Ann Intern Med* 1963, 59:133-44
36. Kubala P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired Autophagy of an Intracellular Pathogen Induced by a Crohn's Disease Associated ATG16L1 Variant. *Wor J Gastoenterol* 3 (10), e3391, 2008
37. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF-alpha, LT-alpha, and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun.* vol. 1, 185-190, 2000
38. Lee Joo, Ye Jianping, Gao Zhanguo, Youn Hyung, Lee Wong, Zhao Ling, Sizemore Niwana, Hwang Daniel „Reciprocal modulation of toll-like receptor 4 signalling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids” *J Biol Chem* , 2003, 278, 37041-51

39. Leedham S, Wright NA. Genetics of Inflammatory Bowel Disease and Associated Cancers” Current Colorectal Cancer Reports 2006, 2:191-199
40. Lefevre MGF, Smith S, Ryan D, Bray S. “Genetic mutations that predict weight loss in an obesity treatment program” Int J Obes Relat Metab Disord. 1998;22:S112
41. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, Vermeire S, Dewit O, de Vos M, Dixon A, Demarche B, Gut I, and 11 others. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. PLoS Genet. 3: e58, 2007. Note: Electronic Article
42. Long MD, Crandall WV, Leibowitz IH, Duffy L, Del Rosario F, Kim SC, Integlia MJ, Berman J, Grunow J, Colletti RB, Schoen BT, Patel AS, Baron H, Israel E, Russell G, Ali S, Herfarth HH, Martin C, Kappelman MD; on behalf of the ImproveCareNow Collaborative for Pediatric IBD. Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2010 Dec 17
43. Martin Lacher, Johanna Helmbrecht, Sebastian Schroepf, Sibylle Koletzko, Antje Ballauff, Martin Classen, Holm Uhlig, Jochen Hubertus, Dominik Hartl Peter Lohse, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler. NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease Journal of Pediatric Surgery (2010) 45, 1591–1597
44. de Luis Roman D, de la Fuente R, Sagrado M, Izaola O, Vivente R. Leptin receptor Lys656Asn polymorphism is associated with decreased leptin response and weight loss secondary to a lifestyle modification in obese patients. Arch Med Res. 2006;37(7):854-9
45. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002 Apr;70(4):845-57. Epub 2002 Mar 1
46. Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Giraud V, Tuzet S, Petiet A, Colas-Linhart N, Fumeron F. Novel polymorphism in the 5' region of the LEP gene:

- association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes*. 1998;47(3):487-9
47. Mammès O, Aubert R, Betoulle D, Péan F, Herbeth B, Visvikis S, Siest G, Fumeron F. Leptin receptor gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(5):398-404
 48. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaría DM, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, García-Paredes J. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Dec;38(12):1235-40.
 49. Mendall MA, Gunasekera AV, John BJ, Kumar D. Is obesity a risk factor for Crohn's disease? *Dig Dis Sci*. 2011 Mar;56(3):837-44. Epub 2011 Jan 8.
 50. Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, Mansfield J, Donaldson P, Macpherson AJ, Forbes A, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am. J. Hum. Genet*. vol. 72, 1018-1022, 2003
 51. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci*. 116: 1679-1688, 2003
 52. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal* 19:1602-1616
 53. Nakamura Motoomi, Tanaka Misuzu, Abe Shimako, Itoh Kazume, Imai Katsumi, Masuda Takashi, Hitomi Nakao. Association between beta 3-adrenergic receptor polymorphism and a lower reduction in the ratio of visceral fat to subcutaneous fat area during weight loss in Japanese obese women. *Nutr Res*. 2000;20(1):25-34
 54. Newman B, Silverberg MS, Gu X, Zhang Q, Lazaro A, Steinhart AH, Greenberg GR, Griffiths AM, McLeod RS, Cohen Z, Fernández-Viña M, Amos CI, Siminovitch K. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and

- disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004 Feb;99(2):306-15
55. Nowicka G. Badania genetyczne w naukach żywieniowych, *Żywnie C człowieka i Metabolizm*, 2007, 6, XXXIV
 56. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606, 2001
 57. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa-B. *J. Biol. Chem.* 276: 4812-4818, 2001
 58. Okabe N. The pathogenesis of Crohn's disease. *Digestion*, 2001, Vol 63 (1), 51-59
 59. Oommen A, Griffin J, Sarath G, Zemleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem.*, 2005, 16(2), 74-7
 60. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Result of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*, 2000;35;1075-81
 61. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis, M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J and 9 others. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R-beta-1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immun.* 168: 5699-5708, 2002
 62. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature Genet.* vol. 36, 471-475, 2004
 63. Rawson E, Nolan A, Silver K, Shuldiner A, Poehlman E. No effect of the Trp64Arg beta(3)-adrenoceptor gene variant on weight loss, body composition, or energy expenditure in obese, Caucasian postmenopausal women. *Metabolism* 2002;51(6):801-5
 64. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM and 13 others. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn

- disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genet.* 39: 596-604, 2007
65. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet.* vol. 66, 1863-1870, 2000
66. Russell RK, Wilson DC, Satsangi J. Untravelling the complex of genetic in inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2004; 89:598-603
67. Shiwaku K, Nogi A, Anuurad E, Kitajima K, Enkhmaa B, Shimono K, Yamane. Difficulty in losing weight by behavioral intervention for women with Trp64Arg polymorphism of the beta-3 adrenergic receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(9):1028-36
68. Słomski i wsp. 2008 Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2008
69. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2004 May;36(5):476-80. Epub 2004 Apr 11
70. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* vol. 419, 107-111, 1997
71. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990-6,
72. (Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* vol. 447, 661-678, 2007
73. Xinli W, Xiaomei T, Meihua P, Song L. „Association of a mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity and response to dietary intervention in Chinese children”. *Acta Paediatr.* 2001;90(11):1233-7

74. Yamada T. Red. naukowa wydania polskiego: Ewa Małecka-Panas. Podręcznik gastroenterologii, Wyd. Czelej, wydanie I, 2006
75. Yang H, Rotter JI. Genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan, S. R.; Shanahan, F. (eds.) : Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. Baltimore: Williams and Wilkins 1994. Pp. 32-64
76. Yang H, Rotter JI. Genetic aspects of idiopathic inflammatory bowel disease” In: Kirsner JB, Shorter RG, editors. Inflammatory bowel disease, ed 4. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995, p.301-331
77. Yoshida Toshihide, Sakane Naoki, Umekawa Tunekazu, Sakai Mayumi, Takahashi Toshihiro, Kondo Motoharu. Mutation of beta 3-adrenergic-receptor gene and response to treatment of obesity. Lancet 1995;346(8987):1433-4
78. Zeisel S. Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline Am J Clin Nutr., 2007, 86(3), 542–548
79. Zheng H, Ji C, Li J, Jiang H, Ren M, Lu Q, Gu S, Mao Y, Xie Y. Cloning and analysis of human Apg16L. DNA Seq. 15: 303-305, 2004