

Rozprawa doktorska

**Ocena wpływu leczenia przeciwciałami anty-TNF-alfa  
na ekspresję wybranych receptorów oraz białek  
biorących udział w procesie apoptozy nabłonka  
i limfocytów blaszki właściwej jelita u pacjentów  
z chorobą Leśniowskiego-Crohna**

**Lek. Piotr Eder**

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Linke**

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



Praca realizowana dzięki grantowi promotorskiemu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa  
Wyższego nr NN401073337

Poznań, 2012

## **PODZIĘKOWANIA**

### **Panu Prof. dr hab. n. med. Krzysztofowi Linke**

Promotorowi, Kierownikowi Katedry i Kliniki, w której mam zaszczyt i przyjemność pracować - za umożliwienie realizacji niniejszej pracy, nieocenioną merytoryczną pomoc na każdym z etapów prowadzonych badań oraz ogromne wsparcie, okazane zaufanie i wielką życzliwość

### **Panu Prof. dr hab. n. med. Maciejowi Zabłowi**

Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii UM w Poznaniu – za umożliwienie realizacji badań oraz nieocenione wsparcie merytoryczne

Spis treści.....	3
Wykaz skrótów.....	5
1. Wstęp.....	8
1.1. Definicja i rola apoptozy.....	8
1.2. Mechanizmy apoptotyczne.....	11
1.2.1. Indukcja apoptozy.....	12
1.2.1.1. Indukcja apoptozy w szlaku zewnątrzpochodnym.....	12
1.2.1.2. Indukcja apoptozy w szlaku wewnątrzpochodnym.....	16
1.2.2. Egzekucja apoptozy.....	20
1.3. Metody detekcji apoptozy.....	23
1.4. Choroba Leśniowskiego-Crohna – rys kliniczny.....	24
1.4.1. Definicja i symptomatologia choroby Leśniowskiego-Crohna.....	24
1.4.2. Epidemiologia choroby Leśniowskiego-Crohna.....	26
1.4.3. Etiopatogeneza choroby Leśniowskiego-Crohna ze szczególnym uwzględnieniem roli procesu apoptozy.....	27
1.4.4. Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna.....	30
1.4.5. Leki biologiczne.....	33
1.4.5.1. Definicja i budowa leków biologicznych.....	33
1.4.5.2. Mechanizmy działania inhibitorów TNF- $\alpha$ ze szczególnym uwzględnieniem roli procesu apoptozy.....	36
1.4.5.3. Badania kliniczne leków biologicznych i zasady ich stosowania.....	42
2. Założenia i cele pracy.....	45
3. Materiał i metody.....	47
3.1. Pacjenci.....	47
3.2. Materiał tkankowy i stosowane odczynniki.....	52
3.3. Metody badań.....	54
3.3.1. Barwienie H+E i ocena aktywności mikroskopowej.....	54

3.3.2. Technika immunocytochemiczna ABC.....	56
3.4. Ocena ekspresji białek i analiza statystyczna.....	57
3.4.1. Półilościowa ocena ekspresji białek.....	57
3.4.2. Analiza statystyczna.....	59
3.5. Zagadnienia etyczne.....	59
4. Wyniki.....	60
4.1. Charakterystyka grupy badanej.....	60
4.2. Aktywność mikroskopowa oraz ocena ekspresji białek w grupie badanej w tkankach zmienionych zapalnie przed leczeniem biologicznym.....	62
4.3. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych z odpowiedzią na terapię.....	68
4.4. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych bez odpowiedzi na terapię.....	73
4.5. Porównanie aktywności mikroskopowej oraz ekspresji białek w tkankach zmienionych zapalnie przed leczeniem w grupie z odpowiedzią oraz w grupie bez odpowiedzi na terapię biologiczną.....	76
4.6. Wpływ leczenia biologicznego na ekspresję badanych białek przed i po terapii w tkankach niezmiennych zapalnie.....	77
4.7. Wybrane korelacje pomiędzy markerami immunocytochemicznymi.....	80
4.8. Wpływ leczenia biologicznego na ekspresję badanych białek oceniane w grupie chorych leczonych infliksymabem i adalimumabem.....	82
5. Dyskusja.....	89
6. Wnioski.....	107
7. Streszczenie.....	109
8. Summary.....	112
9. Bibliografia.....	115
10. Dokumentacja fotograficzna.....	128

## WYKAZ SKRÓTÓW

- **ch.L-C** – choroba Leśniowskiego-Crohna
- **WZJG** – wrzodziejące zapalenie jelita grubego
- **NCHZJ** – nieswoiste choroby zapalne jelit
- **MHC** – major histocompatibility complex (główny antygen zgodności tkankowej)
- **TCR** – T-cell receptor (receptor limocytów T)
- **TNF [sTNF/tmTNF]** – tumor necrosis factor [solubleTNF/transmembraneTNF]  
(czynnik martwicy nowotworów – rozpuszczalny/związany z błoną komórkową)
- **TNFR** – TNF receptor (receptor dla TNF)
- **TRAIL** – TNF-related apoptosis inducing ligand (ligand związany z TNF indukujący apoptozę)
- **DR** – death receptor (receptor śmierci)
- **SODD** – silencer of death domain
- **TRADD** – TNFR associated death domain-containing protein (białko związane z TNFR zawierające domenę śmierci)
- **FADD** – Fas-associated death domain (domena śmierci związana z Fas)
- **DED** – death effector domain (domena efektorowa śmierci)
- **DISC** – death inducing signaling complex (kompleks indukujący sygnalizację prowadzącą do śmierci komórki)
- **FLIPE** – FLICE inhibiting protein (białko hamujące czynnik FLICE)
- **TRAF** – TNFR associated factor (czynnik związany z TNFR)
- **NFκB** – nuclear factor κ beta (czynnik jądrowy kappa beta)
- **RIP** – receptor interacting protein (białko reagujące z receptorem TNFR)
- **IKK** – IκB kinase (kinaza I kappa beta)
- **c-IAP** – cellular inhibitor of apoptosis (komórkowy inhibitor apoptozy)
- **MEKK1** – mitogen activated protein kinase/ERK kinase 1 (kinaza aktywowana mitogenem)
- **JNK** – c-Jun N-terminal kinase
- **CDK** – cyclin-dependent kinase (kinaza zależna od cyklin)
- **VDAC** – voltage-dependent anion channel (kanał anionowy zależny od napięcia)
- **ANT** – adenine nucleotide translocator (transporter dla nukleotydów adeninowych)

- **AIF** – apoptosis inducing factor (czynnik indukujący apoptozę)
- **PTP** – permeability transition pore (por przepuszczalności błonowej)
- **Apaf** – apoptosis protease activating factor (czynnik aktywujący proteazę związaną z indukcją apoptozy)
- **ICE** – interleukin converting enzyme (enzym konwertujący interleukinę)
- **Bid** – Bcl-2-interacting domain (domena reagująca z białkiem Bcl-2)
- **PARP** – poly(ADP-ribose)polymerase [polimeraza poli(ADPrybozy)]
- **CAD** – caspase-activated deoxyribonuclease (deoksyrbonukleaza aktywowana kaspazą)
- **ICAD** – inhibitor of CAD (inhibitor CAD)
- **TUNEL** – terminal deoxynucleotidyl transferase dependent nick and labeling
- **IL** – interleukin (interleukina)
- **IFN** – interferon
- **LPT** – lamina propria T-cells (limfocyty T blaszki właściwej błony śluzowej jelita)
- **IFX** – infliximab (infliksymb)
- **ADA** – adalimumab
- **CER** – certolizumab-pegol
- **ETA** – etanercept
- **TACE** – TNF- $\alpha$  converting enzyme (enzym konwertujący TNF- $\alpha$ )
- **CDC** – complement dependent cytotoxicity (cytotoksyczność związana z układem dopełniacza)
- **ADCC** – antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (cytotoksyczność zależna od przeciwciał)
- **CDAI** – Crohn's Disease Activity Index (indeks aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna)
- **SES-CD** – Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (prosty indeks oceny aktywności endoskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna)
- **CDEIS** – Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (endoskopowy indeks oceny nasilenia aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna)
- **CD** – cluster of differentiation
- **LPMC** – lamina propria mononuclear cells (komórki mononuklearne blaszki właściwej błony śluzowej jelita)
- **LPL** – lamina propria lymphocytes (limfocyty blaszki właściwej błony śluzowej jelita)

- **ECCO** – European Crohn's and Colitis Organisation (europejska organizacja choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego)
- **STAT** – signal transducer and activator of transcription (czynnik związany z przekazywaniem sygnału i aktywacją transkrypcji)
- **CAPK** – ceramide-activated protein kinase (kinaza aktywowana ceramidami)
- **SAPK** – stress associated protein kinase (kinaza aktywowana czynnikami stresowymi)

## 1. Wstęp

Jeszcze do połowy XX wieku uważano, że jedynym procesem prowadzącym do śmierci komórek jest martwica (nekroza). W latach 60-tych zaczęto jednak opisywać zjawisko, które również prowadziło do obumarcia komórek, ale nie przypominało ono dotychczas obserwowanych zmian patologicznych typowych dla nekrozy. W roku 1965 Kerr i wsp. opublikowali pracę, która dotyczyła wpływu ligacji naczyń układu wrotnego wątroby na zjawiska zachodzące w warunkach doświadczalnych w tym narządzie u szczura [1]. Okazało się, że obok typowych zmian martwiczych, odnotowano także rozpad pojedynczych hepatocytów na mniejsze struktury, zawierające obkurczone jądra komórkowe otoczone błoną komórkową. Jak pokazały późniejsze badania były to tzw. ciała apoptotyczne. Natomiast zjawisko zaobserwowane przez Kerr'a i wsp. i odnotowywane także przez innych badaczy zostało w latach 70-tych nazwane apoptozą, czyli tzw. programowaną śmiercią komórek [2-3]. Nazwa pochodziła od greckiego słowa *anoikis*, które oznacza opadanie liści z drzew lub płatków z kwiatu. Apoptoza była następnie przedmiotem intensywnych badań na świecie, czego ukoronowaniem było przyznanie w 2002 roku Nagrody Nobla w zakresie medycyny i fizjologii trzem badaczom tego procesu – Sydneyowi Brennerowi, Howardowi Horvitzowi oraz Johnowi Sulstonowi [4].

### 1.1. Definicja i rola apoptozy

Apoptoza to proces zaprogramowanej śmierci pojedynczej komórki lub rzadziej grupy komórek. Proces ten jest ściśle uporządkowany i kontrolowany. Jest zjawiskiem aktywnym – tzn. wymaga energii potrzebnej m.in. do syntezy szeregu białek i aktywacji określonych szlaków biochemicznych [5]. Najłatwiej prześledzić najistotniejsze cechy definiujące apoptozę przeciwstawiając je zjawiskom typowym dla innego typu śmierci komórek/tkanek czyli martwicy. Martwica wywołana jest zazwyczaj przez bodziec zewnętrzny – np. uraz, promieniowanie jonizujące, niedotlenienie, toksyny i dotyczy grupy komórek, tkanek, czasem całych narządów. To te czynniki doprowadzają do obrzmienia komórki i naruszenia na wczesnym etapie integralności błony komórkowej i struktury organelli komórkowych. To natomiast skutkuje chaotyczną aktywacją szeregu szlaków biochemicznych,

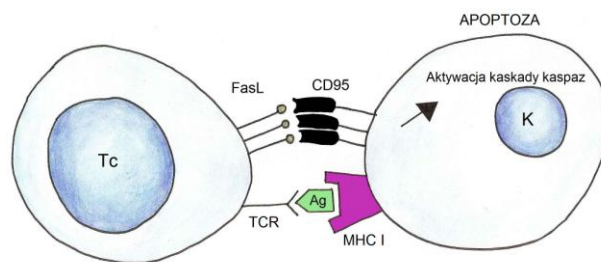


uwolnieniem enzymów lizosomalnych, denaturacją białek cytosolu i rozpadem jądra komórkowego z fragmentacją DNA na odcinki o przypadkowej długości (karioliza). Tak gwałtowne zjawiska zachodzące w wielu komórkach jednocześnie doprowadzają do rozwoju stanu zapalnego, który wyraża się przede wszystkim napływem granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów [6].

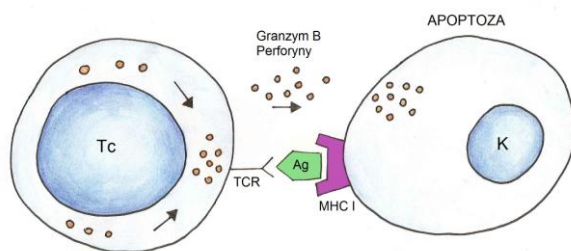
Apoptoza natomiast może być wywołana zarówno przez bodziec zewnętrzny (m.in. wolne rodniki, promieniowanie jonizujące, leki), jak i w wyniku zadziałania czynników wewnętrznych (np. błędy w metabolizmie DNA i wejście na szlak apoptozy przy udziale białka p53). Zjawisko to dotyczy zazwyczaj pojedynczych komórek i, jak wspomniano wyżej, jest procesem aktywnym, ściśle regulowanym. Komórka ulega obkurczeniu przy zachowaniu ciągłości błony komórkowej. Dochodzi do kondensacji DNA (kariopyknoza), a następnie uporządkowanej fragmentacji na odcinki o długości ok. 180-200 par zasad przy udziale specyficznych nukleaz (kariorexis). Błona komórkowa ulega uwypukleniu i dochodzi do rozpadu komórki na tzw. ciała apoptotyczne, zawierające wspomniane fragmenty DNA, nieuszkodzone organelle komórkowe otoczone błoną komórkową. Ciała apoptotyczne są następnie fagocytowane przez sąsiadujące komórki żerne. Zjawiska te nie prowadzą do rozwoju stanu zapalnego [7].

O ile martwica to proces prawie zawsze patologiczny, to apoptoza odgrywa także niezwykle istotną rolę w warunkach fizjologii. Już na etapie rozwoju zarodkowego i płodowego programowana śmierć komórek decyduje o prawidłowości embriologii i organogenezy. Uczestniczy m.in. w rozwoju kończyn wpływając na obumarcie tkanek łączących palce dłoni i stóp, umożliwiając ich rozdzielenie [8]. Odgrywa także ważną rolę w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego [9]. W życiu pozapłodowym ma decydujące znaczenie w zachowaniu homeostazy w populacjach komórek szybko dzielących się, takich jak na przykład komórki nabłonka przewodu pokarmowego, które żyją ok. 7-10 dni i po spełnieniu swych funkcji obumierają na drodze apoptozy, ustępując miejsca nowopowstałym enterocytom [10]. Programowana śmierć komórek stanowi także jeden z najistotniejszych, obok anergii, mechanizmów chroniących organizm przed zjawiskiem autoimmunizacji. W wyniku indukcji apoptozy dochodzi bowiem do eliminacji autoreaktywnych limfocytów, które powstawać mogą codziennie w każdym organizmie [11]. Także na tym zjawisku

opiera się m.in. proces selekcji klonalnej limfocytów w grasicy, decydujący o sprawnym i bezpiecznym funkcjonowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej [12]. Innym przykładem roli apoptozy w procesach fizjologicznych jest jej udział w mechanizmach cytotoksyczności limfocytów T [13]. Komórka zainfekowana wirusem lub na przykład komórka nowotworowa prezentuje swój/swoje antygeny na powierzchni komórki w kompleksie z antygenami zgodności tkankowej MHC I (ang. *major histocompatibility complex*). Taki kompleks rozpoznawany jest przez receptory limfocytów T TCR (ang. *T-cell receptor*). Następnie w wyniku działania białek ziaren cytotoxicylnych limfocytów takich, jak perforyna czy granzym B, które dostają się do wnętrza komórki docelowej, doprowadzają do zniszczeń strukturalnych w jej wnętrzu, dochodzi do aktywacji apoptozy komórki docelowej. Drugi mechanizm obejmuje interakcję receptora CD95 (Fas/Apo-1) na komórce docelowej i liganda na powierzchni limfocyta T, jakim jest Fas-ligand (FasL), co także, doprowadzając do wzbudzenia kaskady procesów, skutkuje programowaną śmiercią komórki docelowej (Ryc.1).



A



B

Ryc. 1 Dwa główne mechanizmy cytotoxyczności limfocytów Tc – (A) indukcja apoptozy przy udziale receptorów z rodziny TNF (receptor CD95, dla której ligandem jest FasL na limfocycie) oraz (B) w wyniku działania enzymów takich jak granzym B czy perforyna. K – komórka docelowa, Tc – limfocyt cytotoksyczny, TCR – receptor limfocyta T, Ag – antygen, MHC I – cząsteczka głównego układu zgodności tkankowej klasy I.

Obok ogromnej roli, jaką odgrywa programowana śmierć komórek w warunkach fizjologii wiadomo, że apoptoza i zaburzenia tego procesu mogą brać udział w patogenezie wielu chorób. Z jednej strony nadmiernie wyrażona apoptoza może skutkować zwiększoną eliminacją komórek. Tak dzieje się m.in. z komórkami  $\beta$  wyspepek Langerhansa w cukrzycy typu I, komórkami pęcherzykowymi tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa czy neuronami w chorobach degeneracyjnych układu nerwowego [14-16]. Z drugiej strony zbyt słabo wyrażona apoptoza może skutkować nieprawidłową kumulacją komórek. Takie zjawiska opisywane są przede wszystkim w przypadku chorób nowotworowych oraz schorzeń o podłożu zapalnym, w tym w całej grupie tzw. chorób z autoimmunizacji [17-19]. Zagadnienie to zostanie szerzej poruszone w dalszej części pracy na przykładzie nieswoistych chorób zapalnych jelit (NCHZJ).

## 1.2. Mechanizmy apoptotyczne

Jak wspomniano wyżej, apoptoza jest procesem ściśle regulowanym i uporządkowanym. Dzieli się on na dwa główne etapy – etap indukcji i egzekucji.

O ile egzekucja apoptozy w większości przypadków przebiega podobnie, to jej indukcja regulowana jest przez kilka mechanizmów.

### 1.2.1. Indukcja apoptozy

Zainicjowanie programowanej śmierci komórek może odbywać się co najmniej w dwojaki sposób. W tzw. szlaku zewnątrzpochodnym kluczową rolę odgrywają interakcje pomiędzy białkami, takimi jak czynnik martwicy nowotworów-alfa TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), FasL czy TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*), a receptorami dla nich – TNFR1, TNFR2 (ang. *tumor necrosis factor receptors*), Fas (inna nazwa CD95 lub Apo-1) czy receptorami DR4, DR5 (ang. *death receptors*). Receptory te z uwagi na swą rolę nazywane są receptorami śmierci. Szlak wewnętrzny natomiast jest wzbudzany zazwyczaj przez różnego rodzaju czynniki uszkodzające, takie jak wolne rodniki, promieniowanie ultrafioletowe, leki i kluczową rolę w nim odgrywają mitochondria i związane z nimi białka z rodziny Bcl-2 [5].

#### 1.2.1.1. Indukcja apoptozy w szlaku zewnątrzpochodnym

Kluczowe znaczenie w szlaku zewnątrzpochodnym mają wspomniane receptory śmierci, należące do nadrodziny cząsteczek czynnika martwicy nowotworów. Zalicza się do nich przede wszystkim TNFR1, TNFR2, Fas i receptory dla TRAIL – m.in. DR4 i DR5, z czego najlepiej poznane są ścieżki sygnałowe związane z aktywacją TNFR1 i Fas [20].

**TNFR1** (p55, CD120 $\alpha$ ) jest białkiem obecnym w błonie komórkowej większości komórek jądrazastych organizmu. Wiąże przede wszystkim TNF- $\alpha$  zarówno w jego formie rozpuszczalnej sTNF (ang. *soluble TNF*) i związanej z błoną komórkową tmTNF (ang. *transmembrane TNF*). Innymi ligandami dla TNFR1 są limfotoksyna- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , nazywana też TNF- $\beta$ ) oraz heterotrimer zawierający TNF- $\beta$  - (LT- $\alpha$ )<sub>2</sub>LT- $\beta$  [21].

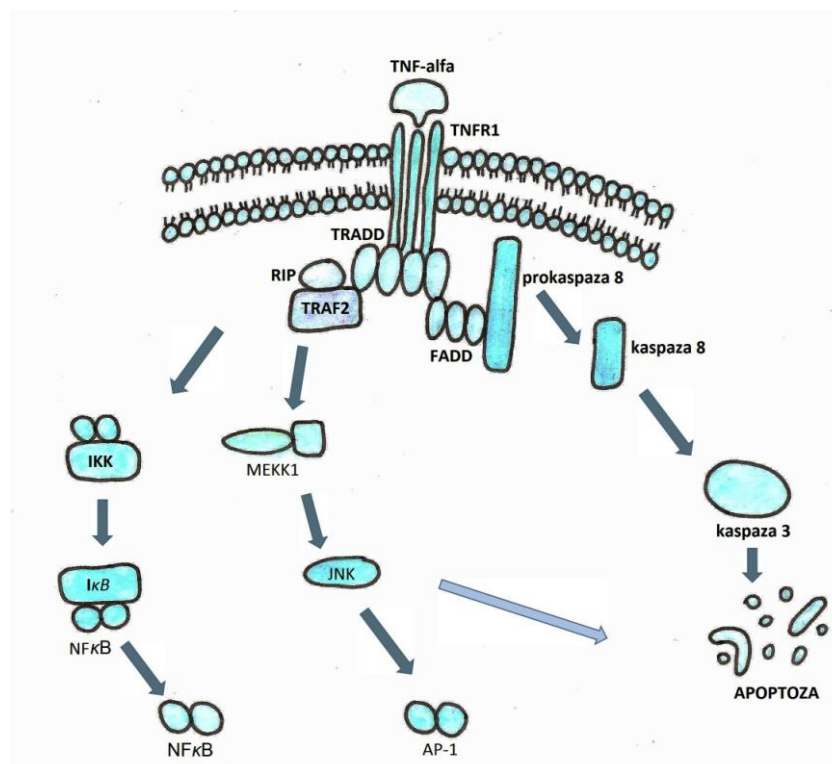
TNFR1 w komórce niepobudzonej występuje w formie monomerycznej, stabilizowanej przez białka SODD (ang. *silencer of death domain*). W wyniku aktywacji po związaniu się z ligandem, TNFR1 ulega homotrimeryzacji. Do tzw. domen śmierci (ang. *death domains*), będących ok. 70-aminokwasowymi wewnątrzkomórkowymi odcinkami TNFR1, przyłącza się białko adaptorowe TRADD

(ang. *TNFR associated death domain-containing protein*), a oddysocjowuje SODD. Następnie przyłączają się kolejne białka adaptorowe i głównie w zależności od tego komórka wchodzi na szlak apoptozy, proliferuje lub stymulowana jest np. do produkcji określonych cytokin czy błonowych molekuł adhezji [22]. Poznane są trzy podstawowe szlaki wynikające z aktywowania TNFR1 (Ryc.2):

- 1) Rekrutacja do kompleksu TNFR1-TRADD białka adaptorowego FADD (ang. *Fas-associated death domain*), które poprzez swoje domeny efektorowe śmierci DED (ang. *death effector domain*) łączy się z analogicznymi domenami prokaspazy 8 (określanej niekiedy skrótem FLICE). Całość tworzy kompleks DISC (ang. *death inducing signaling complex*), po którego utworzeniu dochodzi do autoaktywacji prokaspazy 8. Stanowi ona kluczową kaspazę inicjatorową zaangażowaną w etap egzekucji apoptozy. W wyniku aktywacji kaskady kolejnych kaspaz dochodzi ostatecznie do programowanej śmierci komórki. Naturalnym inhibitorem aktywacji prokaspazy 8 jest białko FLIP (ang. *FLICE inhibiting protein*), uniemożliwiające utworzenie kompleksu DISC [23-24].
- 2) Rekrutacja do kompleksu TNFR1-TRADD białek adaptorowych TRAF2 (ang. *TNFR associated factor 2*) i/lub RIP (ang. *receptor interacting protein*). TRAF2 aktywuje kinazę NIK (ang. *NF- $\kappa$ B inducing kinase*), a RIP – kinazę 3'-fosfatydyloinozytolu PI-3K oraz Akt. W wyniku działania wymienionych kinaz dochodzi do fosforylacji i aktywacji kolejnego układu kinaz – IKK $\alpha$ / $\beta$  oraz IKK $\gamma$  (ang. *I $\kappa$ B kinase*). Te z kolei kinazy fosforylują I $\kappa$ B, który oddysocjowuje od czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*), z którym pozostaje w spoczynku w kompleksie, inaktywując go. Rozdzielenie kompleksu I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B umożliwia czynnikowi NF- $\kappa$ B translokację do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z sekwencjami DNA w obrębie promotorów genów docelowych, może stymulować ich transkrypcję. Uważa się, że aktywacja ścieżki sygnałowej w wyniku pobudzenia TNFR1, w którą zaangażowany jest ostatecznie czynnik NF- $\kappa$ B, prowadzi przede wszystkim do pobudzenia komórki i zahamowania apoptozy [25-26]. Odbywa się to z jednej strony poprzez stymulację syntezy białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, z drugiej strony – poprzez indukcję syntezy komórkowych inhibitorów apoptozy z grupy c-IAP (ang. *cellular inhibitors of apoptosis*). Białka c-IAP (m.in. c-IAP1, c-IAP2, XIAP) bezpośrednio hamują aktywność kaspaz, odgrywających kluczową rolę w etapie egzekucji

apoptozy. Przykładem może być surwiwina, która hamuje kaspazę 3 i 7. Ponadto c-IAP1 oraz białko adaptorowe TRAF2 mogą formować kompleks, który bezpośrednio hamuje aktywność kaspazy 8 [27].

- 3) Rekrutacja białka adaptorowego TRAF2 i aktywacja układu kinazy MEKK1 (ang. *mitogen activated protein kinase/ERK kinase 1*), która wzbudza tzw. szlak JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*). Szlak JNK prowadzi zazwyczaj, poprzez czynnik transkrypcyjny AP-1, do pobudzenia i proliferacji komórki. Istnieją jednak także dowody na proapoptotyczny wpływ aktywacji szlaku JNK. Odbywa się to najprawdopodobniej poprzez rozszczepienie białka z rodziny Bcl-2 – Bid, w wyniku którego powstaje cząsteczka  $\beta$ Bid o masie 24 kDa, która może ulec translokacji do mitochondrium. W wyniku tego dochodzi do uwolnienia z mitochondrium do cytoplazmy tzw. czynnika Diabło. W cytoplazmie czynnik Diabło wiąże i inaktywuje bezpośrednio białka z grupy c-IAP, a także doprowadza do rozdzielenia kompleksu c-IAP-TRAF2. Ostatecznym efektem jest odblokowanie i uaktywnienie kaspaz, w tym kaspazy 8 [28].



Ryc. 2 Schemat transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych z udziałem kompleksu TNF- $\alpha$ -TNFR1. Pełen opis w tekście. Na podstawie [21] w modyfikacji własnej.

Jak pokazują przedstawione dane, aktywacja TNFR1 może skutkować szeregiem efektów na poziomie komórkowym. Jednym z kluczowych jest pobudzenie lub zahamowanie apoptozy. Ostateczny efekt zależy m.in. od typu pobudzanej komórki, jej stanu metabolicznego, obecności dodatkowych kofaktorów itd.

Drugim kluczowym błonowym receptorem śmierci zaangażowanym w indukcję programowanej śmierci komórek jest **Fas** [29]. Białko to może znajdować się w każdej komórce jądrowej ustroju, ale szczególnie wysoką ekspresję wykazuje w komórkach zainfekowanych wirusem i komórkach nowotworowych. Ligandem dla Fas jest FasL, który z kolei w największych ilościach znajduje się w limfocytach T i komórkach NK [30]. Indukcja apoptozy w wyniku interakcji Fas-FasL jest jednym z podstawowych mechanizmów reakcji cytotoksyczności limfocytów T skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym oraz zainfekowanym wirusem (patrz wyżej – Ryc.1). Ponadto odgrywa kluczową rolę w tłumieniu odpowiedzi immunologicznej poprzez eliminację reaktywnych limfocytów po spełnieniu ich roli w reakcji zapalnej (ochrona przed kumulacją pobudzonych komórek układu immunologicznego).

Interakcja FasL z receptorem, czyli Fas, prowadzi, podobnie jak w przypadku TNFR1, do homotrimeryzacji Fas w obrębie błony komórkowej. Z wewnątrzkomórkową domeną śmierci DD białka Fas wiąże się białko adaptorowe FADD. FADD z kolei posiada domeny efektorowe śmierci DED, które reagują z domenami DED prokaspazy 8 [31]. Ostatecznie dochodzi do utworzenia kompleksu DISC i do autoaktywacji prokaspazy 8 do aktywnej formy - kaspazy 8. To zapoczątkowuje etap egzekucji programowanej śmierci komórek, w której uczestniczy kaskada kolejnych kaspaz (Ryc.3).

Odmianą, czy jak twierdzą niektórzy innym typem indukcji szlaku zewnątrzpochoźnego programowanej śmierci komórek, jest aktywacja kaskady kaspaz w wyniku działania enzymu proteolitycznego cytotoksycznych limfocytów T – granzymu B [32]. Zjawisko to jest jednym z mechanizmów cytotoksyczności limfocytów T i polega na wprowadzeniu przez specjalne pory do komórki docelowej (np. komórki nowotworowej) granzymu B w wyniku bezpośredniej interakcji międzykomórkowej z limfocytym T (Ryc.1).

### 1.2.1.2. Indukcja apoptozy w szlaku wewnątrzpochodnym

Szlak wewnątrzpochodny jest zazwyczaj aktywowany przez takie czynniki, jak stres oksydacyjny, promieniowanie jonizujące, brak odpowiednich czynników wzrostu, utrata właściwego „przytwierdzenia” komórki do podłoża czy np. uszkodzenia DNA. W zapoczątkowaniu szlaku wewnątrzpochodnego indukcji apoptozy może uczestniczyć wiele białek. Najlepiej poznanym przykładem jest białko p53, zwane strażnikiem genomu. Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym promującym śmierć komórki. W warunkach fizjologicznych jego stężenie w komórce jest bardzo niskie i p53 jest nieaktywne. W przypadku pojawienia się uszkodzenia DNA (np. w wyniku działania promieniowania jonizującego) aktywowane są specyficzne kinazy, które fosforylują p53 [33]. To skutkuje uczynnieniem p53, które poprzez indukcję inhibitora CDK p21 (ang. *cdk inhibitory protein*) blokuje cykl komórkowy danej komórki. Daje to czas na ewentualną naprawę uszkodzenia DNA. Jeśli mimo tego uszkodzenie nie zostanie naprawione – p53 indukuje ekspresję białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2, jak Bax czy Noxa, które wzbudzają apoptozę w szlaku wewnątrzpochodnym nieprawidłowo funkcjonującej komórki.

Niezależnie jednak od tego czy w indukcję programowanej śmierci komórki w szlaku wewnątrzpochodnym zaangażowane są takie białka, jak np. p53, czy ten etap jest pominięty, kluczowe znaczenie dla tego etapu mają wspomniane białka z rodziny Bcl-2, a najważniejszymi organelami w tym uczestniczącymi są mitochondria [34-35]. Wyróżnia się trzy typy białek należących do rodziny Bcl-2:

- a) grupa antyapoptotycznych protein z kręgu Bcl-2 – Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Boo czy Bcl-w;
- b) grupa proapoptotycznych białek z kręgu Bax – Bax, Bak, Bok;
- c) grupa proapoptotycznych białek z kręgu Bim – Bid, Bik, Bad, Noxa.

Białka te występują w formie dimerów, które mogą tworzyć się w obrębie tożsamy (np. Bax:Bax) lub różnych cząsteczek (np. Bax:Bak). Jak wspomniano wyżej, część z tych białek pobudza apoptozę, a część ją hamuje. Przechylenie więc szali na jedną ze stron decyduje o tym, czy komórka przetrwa czy umrze. Większość zdrowych komórek w czasie pełnienia swoich fizjologicznych funkcji jest odporna na apoptozę. W określonych sytuacjach jednak, np. po spełnieniu swej roli lub pod wpływem



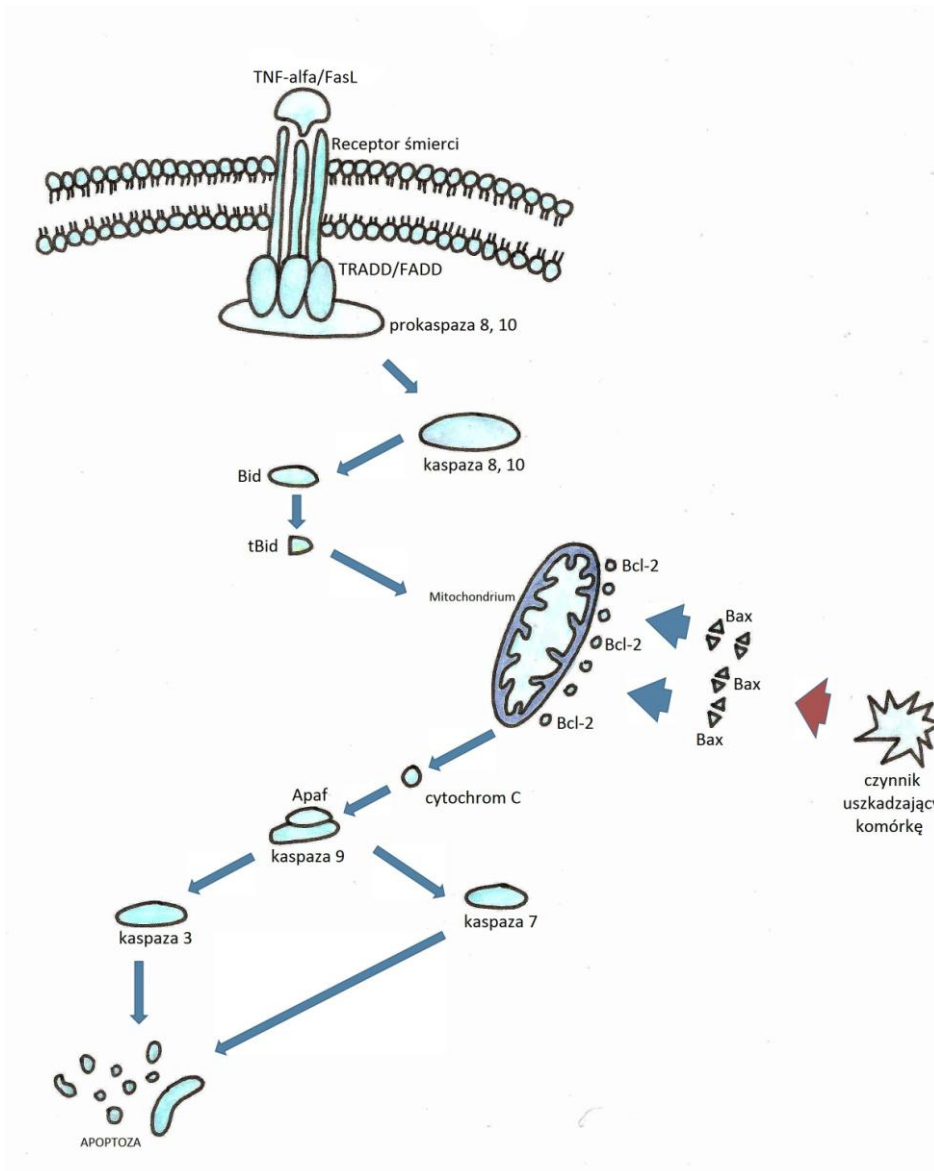
czynników uszkadzających, przewagę zyskują białka takie, jak Bax czy Bak i komórka wchodzi na szlak programowanej śmierci [36-37].

Wciąż toczą się dyskusje nad szczegółami omawianych zjawisk. Wiadomo, że kluczową rolę odgrywają w nich mitochondria. Uważa się, że białka proapoptotyczne w stanie spoczynku znajdują się przede wszystkim w cytosolu, stanowiąc rodzaj swoistego wewnątrzkomórkowego „czujnika” prawidłowości funkcjonowania komórki. Natomiast białka antyapoptotyczne, jak np. Bcl-2, związane są z zewnętrzną błoną mitochondrialną [38]. Najprawdopodobniej stabilizują one niewielkie kanały błonowe, które zapewniają przepływ cząsteczek o ciężarze do 1,5 kDa z wnętrza mitochondrium do cytosolu (np. ATP i ADP). Te kanały to zależny od napięcia kanał anionowy VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) oraz związany z nim kanał dla nukleotydów adeninowych ANT (ang. *adenine nucleotide translocator*). Selektywność tego kanału jest niezwykle ważna, gdyż uniemożliwia przedostawanie się białek zlokalizowanych w przestrzeni między wewnętrzną i zewnętrzną błoną mitochondrialną do cytosolu [39-40]. A wśród tych białek jest szereg silnych induktorów apoptozy, jak cytochrom C, czynnik Diabło czy czynnik indukujący apoptozę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*). Wskutek działania wspomnianych wyżej bodźców uszkadzających, białka proapoptotyczne z cytosolu przemieszczają się w okolice zewnętrznej błony mitochondrialnej i zaburzają stabilizującą funkcję białek antyapoptotycznych [41]. Doprowadza to do upośledzenia funkcji kanałów VDAC i ANT oraz do utworzenia wielkiego kanału błonowego, nazywanego porę zmiany przepuszczalności PTP (ang. *permeability transition pore*) [42]. Ten kanał umożliwia translokację cytochromu C do cytosolu. Cytochrom C natomiast łączy się z białkiem Apaf (ang. *apoptosis protease activating factor*), które zawiera domenę rekrutującą kaspazy, mającą zdolność przyłączania i aktywowania prokaspazy 9. Kompleks cytochromu C, Apaf oraz prokaspazy 9 nazywany jest apoptosomem [43]. Utworzenie apoptosomu umożliwia powstanie aktywnej formy kaspazy 9, która pobudza dalszą kaskadę kaspaz, prowadząc do egzekucji programowanej śmierci komórki (Ryc.4).

Innym białkiem, obok cytochromu C, uwalnianym do cytosolu, jest AIF, który z kolei może bezpośrednio aktywować kaskadę kaspaz. Kolejnym może być omawiamy

wyżej czynnik Diabło, który hamuje funkcję inhibitorów apoptozy z grupy c-IAP i promuje w ten sposób programowaną śmierć komórki [44].

W podsumowaniu części dotyczącej etapu indukcji procesu apoptozy warto podkreślić, że aczkolwiek oba szlaki – zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny regulowane są w inny sposób, to w określonych sytuacjach mogą się zazębiać i wpływać na siebie. Przykładem tego może być np. pomocnicza rola białek z rodziny Bcl-2 w indukcji apoptozy w szlaku zewnątrzpochodnym w niektórych typach komórek. Większość komórek, w których dochodzi do wzbudzenia apoptozy w wyniku stymulacji receptorów śmierci nie wymaga do skutecznej aktywacji kaspaz dodatkowych kofaktorów (tzw. komórki I typu). Jednak w części komórek (tzw. komórki II typu) aktywacja, w wyniku pobudzenia receptorów śmierci, kaspaz inicjatorowych takich, jak kaspaza 8 czy 10 nie jest wystarczające dla uczynnienia kaspaz efektorowych (np. kaspazy 3). W takich sytuacjach niezbędny jest udział białka należącego do rodziny Bcl-2 – Bid (ang. *Bcl-2-interacting domain*), które stymulowane przez aktywną kaspazę 8 lub 10, ulega translokacji do mitochondrium i umożliwia przedostanie się cytochromu C z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu. To, jak opisano wyżej, prowadzi do utworzenia apoptosomu i aktywacji kaspazy 9 [45-46]. To ostatecznie doprowadza do uczynnienia kaspaz efektorowych i skutecznej kontynuacji egzekucji apoptozy (Ryc.3).



Ryc. 3 Indukcja apoptozy w szlaku wewnątrzpochodnym oraz schemat indukcji apoptozy w tzw. komórkach II typu. Pełen opis w tekście. Rycina na podstawie Acta Biochim Biophys Sin 2005; 37:719-727, w modyfikacji własnej.

### 1.2.2. Egzekucja apoptozy

Egzekucja apoptozy obejmuje ostateczne etapy programowanej śmierci komórki. Kluczową rolę odgrywają tutaj enzymy należące do grupy proteaz cysteinowych zwane kaspazami. Kaspazy występują w cytoplazmie w formie proenzymów i mają postać pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Charakterystyczną cechą tej grupy białek jest ich kaskadowa aktywacja – tzn. uczynienie kaspazy jednego typu skutkuje proteolitycznym uczynieniem kolejnego enzymu w określonej sekwencji. Wskutek ich aktywacji dochodzi do podziału łańcucha na łańcuch długi i krótki z odcięciem N-końcowej prodomeny, po czym 2 łańcuchy krótkie i długie agregują tworząc tetramer posiadający 2 aktywne miejsca katalityczne [47]. Jak dotąd poznano 14 typów kaspaz. Wyróżnia się 3 podgrupy tych enzymów [39]:

- a) kaspazy inicjatorowe, które biorą udział w początkowych etapach egzekucji apoptozy – kaspaza 2, 8, 9, 10;
- b) kaspazy efektorowe, biorące udział w ostatniej fazie egzekucji apoptozy – kaspaza 3, 6 i 7;
- c) kaspazy zaangażowane w procesy zapalne – kaspaza 1, 4, 11, 12, 13, 14.

Ostatnia podgrupa nie uczestniczy bezpośrednio w apoptozie – np. kaspaza 1, zwana także enzymem konwertującym interleukinę 1 ICE (ang. *interleukin-1 converting enzyme*) bierze udział w aktywacji interleukiny 1 $\beta$ .

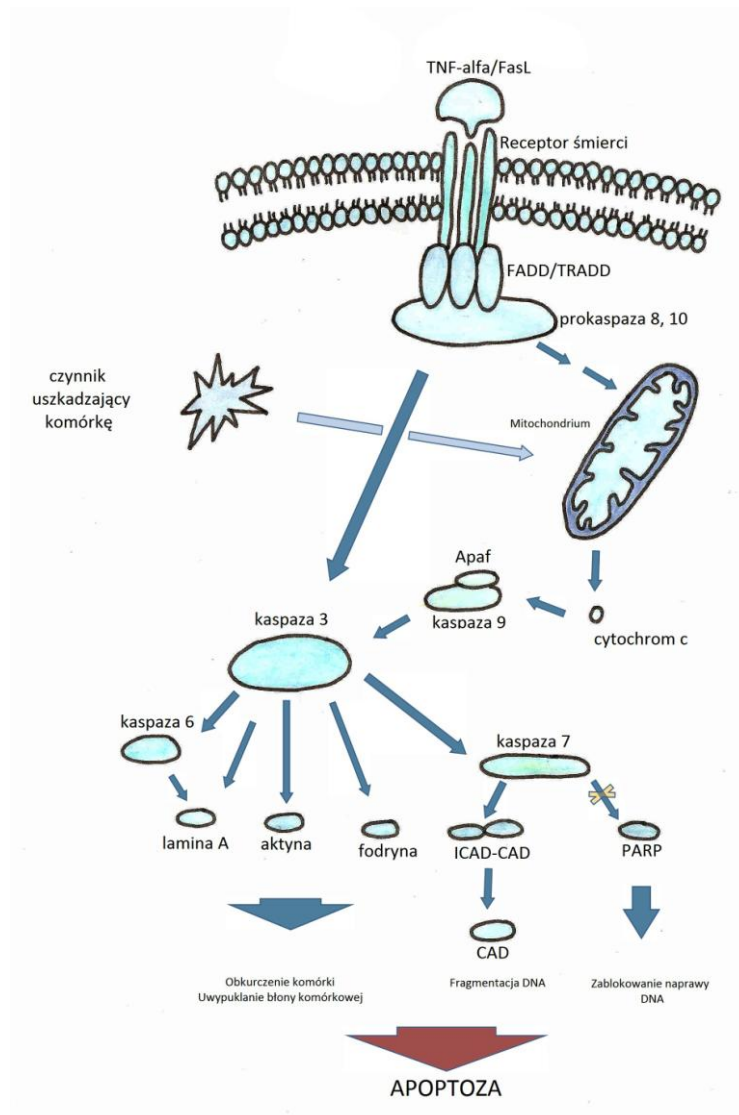
Jak wspomniano w rozdziale na temat indukcji programowanej śmierci komórek – ostateczna aktywacja kaspaz zachodzi w dwóch podstawowych szlakach. Pierwszy z nich jest efektem aktywacji błonowych receptorów śmierci. Tutaj kluczową rolę odgrywa kaspaza 8 i 10 [48-49]. W wyniku interakcji ligand-receptor dochodzi, przy udziale odpowiednich białek adaptorowych, do utworzenia kompleksu DISC, w skład którego wchodzi przede wszystkim białko FADD oraz prokaspaza 8. Szczegóły tego etapu zostały opisane w rozdziale 1.2.1.1. Podobnie przebiega aktywacja ścieżki sygnałowej z udziałem prokaspazy 10.

Drugim szlakiem doprowadzającym do uaktywnienia kaspaz inicjatorowych jest szlak wewnątrzpochozny. Tutaj w wyniku działania m.in. czynników uszkodzających dochodzi do uwolnienia z mitochondriów, przy udziale białek z rodziny Bcl-2,

cytochromu C [50]. Ten formuje kompleks z białkiem Apaf oraz prokaspazą 9 tworząc apoptosom. Szczegóły tego etapu opisano w rozdziale 1.2.1.2.

Odmiennym typem aktywacji kaskady kaspaz – z pogranicza szlaku zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego są procesy zachodzące w tzw. komórkach typu II. Tutaj wtórnie do pobudzenia szlaku prokaspazy 8 i/lub 10 dochodzi do „wzmocnienia” sygnalizacji wewnątrzkomórkowej przy pomocy białka z rodziny Bcl-2 – Bid. W tej sytuacji ostatecznie w inicjacji egzekucji programowanej śmierci komórki uczestniczą prokaspaza 8 i 10 oraz 9 [45]. Szczegóły zostały omówione w rozdziale 1.2.1.2.

Aktywacja kaspaz inicjatorowych skutkuje uczynnieniem grupy kaspaz efektorowych, spośród których kluczową rolę odgrywa **kaspaza 3** [51-53]. Kaspaza 3 może następnie pobudzać inne kaspazy efektorowe – 6 i 7, oraz sama wpływać na aktywację bądź unieczynnienie poszczególnych białek komórkowych [54-55]. Z jednej strony dochodzi do zależnej od kaspazy 3 reorganizacji szkieletu wewnątrzkomórkowego oraz zmian strukturalnych w jądrze komórkowym, co umożliwia utworzenie ciałek apoptotycznych. Biorą w tym udział takie białka, jak aktyna, fodryna czy lamina A [39,56]. Z drugiej strony kaspaza 3 wpływa na unieczynnienie enzymów zaangażowanych w naprawę DNA, przykładem jest polimeraza poli-ADP-rybozy PARP [ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*] [57]. Innym białkiem aktywowanym przez kaspazę 3 jest DNA-za aktywowana przez kaspazy CAD (ang. *caspase-activated deoxyribonuclease*), która ulega uczynnieniu w wyniku oddysocjowania od CAD jej inhibitora – ICAD (ang. *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*) [58]. CAD jest głównym enzymem odpowiedzialnym za cięcie DNA w odcinkach między sąsiadującymi nukleosomami, czyli na fragmenty o długości ok. 180-200 par zasad (Ryc.4).



Ryc. 4 Schemat etapu egzekucji apoptozy. Pełen opis w tekście. Rycina na podstawie Acta Biochim Biophys Sin 2005; 37:719-727, w modyfikacji własnej.

Morfologicznym efektem opisywanych zjawisk zależnych od kaspaz jest uwolnienie się komórki z połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową i sąsiednimi komórkami oraz jej obkurczenie. Dochodzi do uwypuklenia się błony komórkowej, reorganizacji szkieletu wewnątrzkomórkowego z degradacją części białek cytoplazmatycznych oraz kondensacji i uporządkowanego rozpadu chromatyny. Powstają ciała apoptotyczne, które usuwane są w wyniku fagocytozy przez komórki żerne (głównie makrofagi). Rozpoznawanie ciałek apoptotycznych przez fagocyty jest możliwe dzięki specjalnym właściwościom błony tych struktur. Otóż w wyniku

uczynienia przez AIF enzymu floppazy dochodzi do przemieszczenia fosfatydyloseryny, która w naturalnych warunkach występuje jedynie po wewnętrznej stronie błony komórkowej oraz w błonach wewnątrzkomórkowych, na zewnętrzną powierzchnię tej organelli komórkowej [59].

### 1.3. Metody detekcji apoptozy

Istnieje kilka metod wykrywania zjawiska apoptozy [5,60-61]. Najpowszechniej stosowane to:

- A) Ocena wyglądu komórek w mikroskopie świetlnym lub mikroskopie fluorescencyjnym po wyznakowaniu barwnikami takimi, jak bizbenzimid.
- B) Metoda histologiczna, polegająca na znakowaniu wolnych końców DNA z udziałem końcowej transferazy deoksynukleotydów TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase dependent nick and labelling*).
- C) Metoda immunocytochemiczna, polegająca na wykrywaniu ekspresji aktywnej formy kaspazy 3.
- D) Wykrywanie produktów degradacji substratów dla kaspaz – np. fragmentów PARP przy pomocy techniki Western blot.
- E) Technika fluorescencyjna z wykorzystaniem aneksyny V (z użyciem jodku propidyny) wiążącej w błonie komórkowej fosfatydyloserynę.
- F) Technika rozdziału elektroforetycznego DNA komórek, która wykorzystuje fakt uporządkowanego cięcia DNA w wyniku apoptozy, co daje charakterystyczny obraz „drabinki DNA” w żelu agarozowym.

## 1.4. Choroba Leśniowskiego-Crohna – rys kliniczny

### 1.4.1. Definicja i symptomatologia choroby Leśniowskiego-Crohna

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ch.L-C) należy, obok wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG), do głównych jednostek chorobowych zaliczanych do grupy nieswoistych chorób zapalnych jelit (NCHZJ). Istotą choroby jest przewlekły stan zapalny w obrębie ściany przewodu pokarmowego na całej jej grubości – od błony śluzowej, poprzez błonę podśluzową, mięśniową i przydanekę. Proces ten prowadzi do uszkodzenia ściany jelita, co skutkuje różnego stopnia upośledzeniem jego funkcji. Choroba może lokalizować się w sposób nieciągły w każdym odcinku przewodu pokarmowego – od jamy ustnej aż po odbyt. Oznacza to, że fragmenty zmienionego chorobowo jelita mogą być poprzedzielane odcinkami nie wykazującymi cech patologii. Najczęstszą lokalizacją zmian chorobowych jest końcowy odcinek jelita krętego (40-50% chorych). U około 30-40% pacjentów zmiany dotyczą okolicy krętniczo-kątniczej. Inną częstą lokalizacją (ok. 20% przypadków) jest wyłącznie jelito grube. Najrzadziej ch.L-C lokalizuje się w górnym odcinku przewodu pokarmowego, czyli w jamy ustnej, przełyku, żołądku czy dwunastnicy. W części natomiast przypadków ch.L-C wykazuje rozсіяną, odcinkową lokalizację w obrębie całego przewodu pokarmowego. Charakterystyczne jest to, że dana lokalizacja zmian chorobowych pozostaje zazwyczaj stała na przestrzeni czasu. Szacuje się na przykład, że wśród pacjentów z zajęтым jelitem cienkim jedynie u < 20% dojdzie do rozwoju zmian w jelicie grubym po okresie 10 lat [62-66].

Choroba przebiega w charakterystyczny sposób – naprzemiennie występują okresy zaostrzeń i remisji, jedynie u około 10-15% symptomy występują w sposób ciągły. W fazie zaostrzenia ch.L-C spośród objawów ogólnych, wynikających głównie z zapalnej natury schorzenia, należy wymienić osłabienie, gorączkę, spadek masy ciała [67]. Inne dolegliwości wynikają głównie z lokalizacji zmian zapalnych:

- a) W lokalizacji krętniczej (lub krętniczo-kątniczej) dominują dodatkowo bóle brzucha, niekiedy imitujące ostre zapalenie wyrostka robaczkowego.



- b) W przypadku zajęcia przez proces chorobowy jelita grubego, częściej niż w innych postaciach, pojawia się biegunka, czasem z obecnością świeżej krwi. Ta lokalizacja ch.L-C wiąże się nierzadko z zajęciem okolicy okołodbytowej, co może manifestować się występowaniem ropni, szczelin odbytu, przetok okołodbytowych czy wyrośli skórnych.
- c) W wyniku rozległego zajęcia pętli jelita cienkiego także może pojawić się biegunka, często tłuszczowa, wynikająca z zaburzenia funkcji absorpcyjnej tego odcinka przewodu pokarmowego. W tej lokalizacji szczególnie nasilone są objawy niedoborowe manifestujące się przede wszystkim niedożywieniem białkowo-kalorycznym.
- d) Rzadko występująca postać ch.L-C z zajęciem żołądka i dwunastnicy przyjmuje natomiast obraz odpornej na leczenie choroby wrzodowej. W przypadku lokalizacji zmian w przełyku pojawia się odynofagia lub/i dysfagia, natomiast gdy patologia dotyczy jamy ustnej – rozwijają się niegojące się afty i owrzodzenia w obrębie błony śluzowej policzków, podniebienia czy dziąseł.

Przebieg ch.L-C jest zazwyczaj progresywny, co po latach często prowadzi do kalectwa. W początkowym stadium dominują bowiem objawy zapalne, natomiast wraz z postępowaniem choroby zaczynają pojawiać się przetoki, ropnie i zwężenia przewodu pokarmowego, zaliczane do tzw. powikłań jelitowych schorzenia, a zmiany zapalne ulegają częściowej redukcji [68].

Przetoki można podzielić na zewnętrzne i wewnętrzne. Wśród przetok zewnętrznych wyróżniamy przetoki brzuszne jelitowo-skórne oraz przetoki okołodbytowe. Ten drugi podtyp jest często spotykany zwłaszcza u chorych z zajęciem jelita grubego. Według różnych danych problem ten dotyczy nawet 20-25% chorych po 20 latach trwania choroby. Przetoki okołodbytowe klasyfikujemy jako proste oraz złożone – te drugie charakteryzują się obecnością rozgałęzionego kanału, często są zakażone i stwierdza się obecność ropni okołodbytowych. Spośród przetok wewnętrznych należy natomiast wymienić przetoki jelitowo-pęcherzowe (do pęcherza moczowego), jelitowo-pochwowe u kobiet czy międzypętlowe (pomiędzy pętlami jelit). Przetoki wewnętrzne wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ropni śródbrzuszných [69-71].

Innym niezwykle rzadkim powikłaniem jelitowym ch.L-C może rak jelita grubego (lub jeszcze rzadziej jelita cienkiego). Dane potwierdzające związek przewlekłego stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym ze zjawiskiem kancerogenezy są dość skąpe, więcej tego typu badań dotyczy WZJG, niemniej jednak uważa się, że ch.L-C może sprzyjać neoplazji śródnapłonkowej i tym samym rozwojowi procesu nowotworowego. Ryzyko to zwiększa się wraz z czasem trwania choroby i zależy w głównej mierze od aktywności procesu zapalnego. Oznacza to, że im choroba jest gorzej kontrolowana, tym to ryzyko jest większe [72].

Odrębną grupą powikłań ch.L-C są powikłania pozajelitowe. Zaliczamy do nich przede wszystkim zapalenie stawów, zaburzenia gęstości mineralnej kości (osteopenia, osteoporoza), rumień guzowaty i zgorzelinowe zapalenie skóry, zapalenie spojówek i błony naczyniowej oka czy pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych [73].

#### 1.4.2. Epidemiologia choroby Leśniowskiego-Crohna

Częstość występowania NCHZJ stale rośnie [66]. Zarówno ch.L-C jak i WZJG dotyczą przede wszystkim ludzi młodych. Szczyt zachorowalności na ch.L-C przypada na 20 – 30 r.ż., nieznacznie częściej chorują kobiety. Wyjątkiem są kraje, gdzie zapadalność na ch.L-C jest stosunkowo niska – tu nieznacznie częściej chorują mężczyźni. Istnieją rozbieżności w ocenie zapadalności i częstości występowania ch.L-C w zależności od lokalizacji geograficznej. W Ameryce Północnej częstość występowania według różnych danych waha się między 44 – 201/100000 ludności, w Europie – odpowiednio między 8 – 214/100000 ludności [74-76]. Ekstrapolując dane epidemiologiczne szacuje się, że jest ok. 1 milion chorych na ch.L-C w Europie. W większości krajów chorobą częściej spotykaną jest WZJG – wyjątkiem jest np. Kanada, gdzie proporcje są odwrotne [77]. Niezwykle interesujące są dane pokazujące jak zmieniają się trendy epidemiologiczne dotyczące NCHZJ na przestrzeni lat. Badania populacji Olmsted County w Minnesocie wykazały, że częstość występowania ch.L-C wzrosła z 91/100000 ludności w 1965 roku do 174/100000 ludności w roku 2001 [78]. W północnej Francji zapadalność na ch.L-C wzrosła z 5,3/100000 w 1988 roku do 6,4/100000 w roku 2005 [79].

#### 1.4.3. Etiopatogeneza choroby Leśniowskiego-Crohna ze szczególnym uwzględnieniem roli procesu apoptozy

Etiologia ch.L-C wciąż jest nieznana. Od wielu lat obowiązuje hipoteza, że do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego w przebiegu NCHZJ prowadzi nieadekwatnie wyrażona odpowiedź układu immunologicznego na określone antygeny w obrębie przewodu pokarmowego w obliczu określonych czynników środowiskowych u genetycznie predysponowanej osoby [80-81].

Wspomnianym wyżej bodźcem antygenowym są najprawdopodobniej antygeny bakteryjne. Wystarczy wspomnieć, że liczba komórek bakteryjnych w świetle przewodu pokarmowego wielokrotnie przewyższa liczbę wszystkich komórek ludzkiego organizmu, by zdać sobie sprawę, jak trudną do odegrania rolę ma układ immunologiczny przewodu pokarmowego w odróżnieniu antygeny, który musi być wyeliminowany od antygeny niepatogennego [82-83]. I właśnie nieprawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego doprowadza ostatecznie do nagromadzenia komórek odpowiedzi zapalnej w przewodzie pokarmowym. Dotyczy to zarówno komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej takich, jak makrofagi czy granulocyty obojętnochłonne, jak i komórek zaangażowanych swoiście w mechanizmy obronne – głównie limfocytów, a przede wszystkim komórek CD4 (limfocyty T pomocnicze – Th), w mniejszym stopniu limfocytów CD8 (głównie limfocyty T cytotoksyczne) [84]. W ch.L-C dominuje wzbudzenie odpowiedzi Th1 i Th17-zależnej, współuczestniczącej w wydzielaniu takich cytokin, jak interleukina-2 (IL-2), IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) czy IL-17, IL-22 i IL-23. Natomiast w WZJG przeważają komórki Th2, a spośród cytokin kluczową rolę pełnią IL-4, IL-5 czy IL-10 [85-86].

Uważa się, że zaburzenia procesu apoptozy mają istotne znaczenie w patogenezie NCHZJ. Z jednej strony nadmiernie wyrażona apoptoza komórek nabłonka doprowadza do ich wzmożonej eliminacji i uszkodzenia bariery jelitowej. Z drugiej strony opisuje się zmniejszoną programowaną śmierć komórek nacieku zapalnego, co prowadzi do ich kumulacji w ścianie przewodu pokarmowego i podtrzymania zapalenia [19].

W zdrowym jelicie wzbudzona reakcja zapalna ulega samoograniczeniu w dwóch podstawowych mechanizmach – anergii i apoptozy immunoreaktywnych komórek (głównie obserwacje te dotyczą limfocytów T). W pierwszym z nich komórki tracą wrażliwość na kolejne sygnały stymulujące, przede wszystkim w związku ze zmianami w ekspresji błonowych białek pełniących funkcję niezbędnych kofaktorów interakcji międzykomórkowej, i stają się „nieaktywne” immunologicznie. Drugi z omawianych mechanizmów polega na programowanej śmierci limfocytów T w wyniku oddziaływań z innymi limfocytami. Główną rolę odgrywa tutaj pobudzenie szlaku zewnątrzpochodnego apoptozy zależnego od układu Fas (na komórce docelowej) i FasL (na innym limfocycie) [13,87]. Okazuje się, że limfocyty T blaszki właściwej LPT (ang. *lamina propria T-cells*) zdrowego jelita wykazują naturalnie wyższą wrażliwość na sygnały proapoptotyczne w stanie spoczynku w porównaniu z limfocytami T krwi obwodowej. Efekt ten potęguje się w przypadku pobudzenia limfocytów T – wówczas ta różnica ulega zwielokrotnieniu [88]. Ten fizjologicznie wysoki potencjał proapoptotyczny LPT prawdopodobnie ma związek z paradoksalnym działaniem IL-2. Otóż ta, pobudzająca z początku proliferację limfocytów T cytokina, po wzbudzeniu reakcji zapalnej stymuluje ekspresję FasL, mediując reakcje cytotoksyczności skierowane przeciw reaktywnym limfocytom T. Ponadto jej malejące w czasie stężenie w okresie wygaszania zapalenia samo w sobie stanowić może czynnik indukujący apoptozę komórek, na które w większych stężeniach wpływała proproliferacyjnie (w mechanizmie wynikającym z ustania interakcji między swoistym czynnikiem wzrostowym dla komórek T, jakim jest IL-2, a LPT) [89].

Zaburzenie tych naturalnych procesów eliminacji LPT obserwuje się w NCHZJ. Dotyczy to zarówno WZJG, jak i ch.L-C, niemniej jednak wydaje się, że defekt ten jest silniejszy w przypadku tej drugiej jednostki chorobowej. Badania na ten temat zapoczątkowała Boirivant i wsp. (1999r.). W jej obserwacjach LPT pochodzące od pacjentów z NCHZJ wykazywały podobne ilości Fas w obrębie błony komórkowej, ale były oporniejsze na programowaną śmierć komórkową indukowaną w układzie Fas-FasL [90]. Dodatkowo w przypadku ch.L-C obserwowano zwiększoną przeżywalność LPT w wyniku stymulacji w proapoptotycznym szlaku zależnym od białka CD2 (białko błonowe limfocytów będące niezbędnym kofaktorem wielu interakcji

międzykomórkowych). Jak pokazały dalsze obserwacje, upośledzona apoptoza LPT w WZJG zależna jest bezpośrednio od układu Fas-FasL, a elementem mogącym o tym decydować jest wysokie stężenie wewnątrzkomórkowego inhibitora kaspazy 8 – białka FLIP. Prowadzi to do bloku apoptozy na poziomie początkowych reakcji z udziałem kaspaz inicjatorowych, natomiast nie ma zaburzeń w zakresie mechanizmów zależnych od mitochondriów [91-93]. W przypadku natomiast ch.L-C powstaje głębszy defekt apoptozy reaktywnych LPT. Tutaj najprawdopodobniej kluczowe znaczenie ma wzrost ekspresji białek z rodziny Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym (np. Bcl-2, Bcl-x), który czyni limfocyt opornym na działanie szeregu bodźców proapoptotycznych [94-96]. Jeśli weźmiemy pod uwagę także fakt, że LPT w ch.L-C wykazują znacznie zwiększony potencjał proliferacyjny, wyrażający się szybszym przebiegiem cyklu komórkowego w porównaniu nie tylko z WZJG, ale także z innymi schorzeniami zapalnymi (np. z toczniem rumieniowatym układowym), daje nam to pełen obraz zaburzeń homeostazy komórkowej ze zdecydowaną przewagą zjawisk promujących przeżycie LPT [92]. Doprowadza to do powstania błędnego koła zjawisk zapalnych, skutkujących progresją zapalenia i wynikającym z tego zniszczeniem tkanek.

Dotychczas przedstawiono dane dotyczące zaburzeń apoptozy LPT, jako przyczyny kumulacji komórek zapalnych w ścianie jelita. Jak jednak wspomniano wyżej nieprawidłowości w zakresie programowanej śmierci komórek w NCHZJ dotyczą także nabłonka jelita. Tutaj jednak proces ten jest nadmiernie wyrażony i doprowadza do zintensyfikowanej eliminacji epitelium przewodu pokarmowego. W zdrowym jelicie apoptoza nabłonka jest procesem fizjologicznym i uczestniczy w usuwaniu komórek, które spełniły już swoją funkcję. Komórki epitelium jelita są jedną z najdynamiczniejszych populacji komórkowych w ludzkim organizmie. Uważa się, że w ciągu 3-5 dni dochodzi do całkowitej odnowy warstwy nabłonkowej w przewodzie pokarmowym. Programowana śmierć komórek epitelium ma miejsce przede wszystkim w częściach szczytowych kosmków jelitowych w jelicie cienkim oraz w nabłonku powierzchniowym w jelicie grubym [19].

Zarówno w WZJG, jak i ch.L-C obserwuje się zwiększony odsetek komórek apoptotycznych w nabłonku w porównaniu z grupami kontrolnymi. Warto jednak nadmienić w tym miejscu, że apoptoza epitelium w WZJG wydaje się być bardziej

nasiloną niż w przypadku ch.L-C, więcej także wiadomo na temat jej patomechanizmu. Większość badań pokazuje bowiem, że zachodzi ona w wyniku reakcji Fas-FasL. Receptor Fas jest obecny na komórkach nabłonka (komórki docelowe), natomiast komórkami efektorowymi są LPT, wykazujące wzmożoną ekspresję FasL w tkankach zmienionych zapalnie. W ten sposób LPT indukują programowaną śmierć komórek nabłonka, doprowadzając do uszkodzenia bariery jelitowej. Innym, aczkolwiek mniej prawdopodobnym mechanizmem, jest interakcja wzajemna między komórkami epitelium w układzie Fas-FasL [97-98].

W przypadku ch.L-C nie dysponujemy tak jednoznacznymi danymi. Najważniejsze z dotychczas przeprowadzonych badań nad apoptozą komórek nabłonka w tym schorzeniu przez Di Sabatino i wsp. (2003r.) zanegowało rolę układu Fas-FasL w tym procesie [99]. Poszukując innych potencjalnych mechanizmów badano także wpływ utraty kontaktu komórki nabłonkowej z podłożem (błona podstawna), jako ewentualnej przyczyny nasilenia apoptozy. Dane w tym zakresie są jednak niejednoznaczne [100].

Podsumowując należy podkreślić, że mimo coraz większej ilości informacji będących rezultatem prowadzonych na całym świecie badań nad etiopatogenezą NCHZJ, wciąż nasza wiedza na ten temat jest spekulatywna. Podobnie jest z oceną roli zaburzeń programowanej śmierci komórek jako jednej z przyczyn ch.L-C. Niezaprzeczalnie nieprawidłowości przebiegu apoptozy odgrywają istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego w ścianie przewodu pokarmowego, ale nadal potrzebne są badania w tym zakresie, a w szczególności badania *in vivo* na pacjentach.

#### 1.4.4. Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna

Leczenie ch.L-C obejmuje zarówno postępowania farmakologiczne, jak i chirurgiczne. Do wskazań wybiórczych do leczenia chirurgicznego zaliczamy ropnie i inne powikłania septyczne, przetoki wewnętrzne i zewnętrzne, rozległe zmiany okołodbytowe, stwierdzenie lub podejrzenie raka, opóźnienie rozwoju fizycznego z zahamowaniem wzrostu u dzieci czy brak skuteczności postępowania

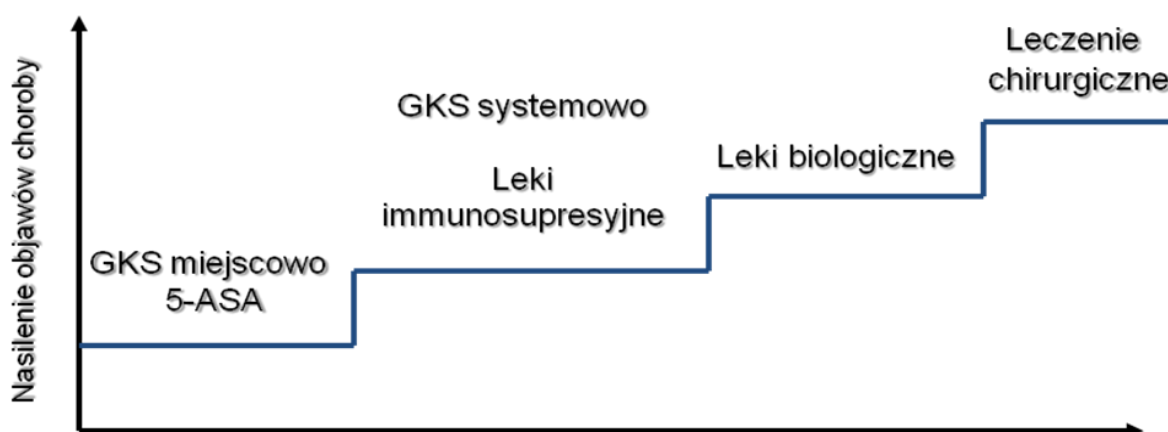
zachowawczego. Wskazaniem nagłym do zabiegu operacyjnego jest niedrożność będąca konsekwencją zwężenia przewodu pokarmowego, perforacja jelita czy masywny krwotok [62,64].

Jeśli chodzi o leczenie farmakologiczne, stosuje się kilka grup leków w zależności od stanu klinicznego chorego [62,64,101]:

- a) Aminosalicylany (mesalazyna, a w przypadku zmian tylko w jelicie grubym - sulfasalazyna) – rekomendacje większości towarzystw zalecają stosowanie tej grupy leków w lekkim i umiarkowanym rzucie choroby. Najczęściej podawane doustnie w tabletkach, w dystalnej postaci ch.L-C jelita grubego w formie czopków doodbytniczych lub wlewek. Skuteczność aminosalicylanów w aktywnej postaci jest wątpliwa, niemniej jednak dopuszcza się ich stosowanie także w tej postaci choroby.
- b) Steroidy – podstawowa grupa leków w umiarkowanym i ciężkim rzucie ch.L-C. Oprócz steroidów działających ogólnie (w postaci doustnej lub dożylniej), stosuje się także budezonid – doustny steroid o silnym działaniu miejscowym w przypadku lokalizacji krętniczko-kątniczej. Rzadziej – w dystalnej postaci ch. L-C jelita grubego rozważyć można miejscowe leczenie z użyciem wlewek lub pianek steroidowych (postać łagodna).
- c) Leki immunosupresyjne – azatiopryna, 6-merkaptopuryna, metotreksat. Wykazują szczególnie dużą przydatność w leczeniu podtrzymującym ch.L-C. Stosowane zazwyczaj w przypadku nawrotu choroby, a także braku odpowiedzi na steroidy lub rozwoju zjawiska steroidozależności.
- d) Antybiotyki – w powikłaniach infekcyjnych (m.in. ropnie okołodbytowe).
- e) Leki biologiczne – nowa grupa leków stosowana w przypadku braku odpowiedzi lub nietolerancji steroidów i/lub leków immunosupresyjnych. Szczegółowego omówienia leków biologicznych dokonano w rozdziale 1.4.5.

Oprócz wymienionych wyżej podstawowych grup leków stosuje się również zależne od stanu chorego i problemu klinicznego dodatkowe leki (np. profilaktyka lub leczenie osteoporozy) i inne formy terapii (m.in. u chorych niedożywionych – żywienie enteralne i parenteralne).

Aktualnie obowiązującą strategią w leczeniu ch.L-C jest strategia „step-up”. Polega ona na stopniowym, wraz z postępem choroby i nasileniem objawów, włączaniu leków o coraz większej sile działania. Ostatnim szczeblem tej drabiny terapeutycznej jest włączenie leczenia biologicznego lub leczenie chirurgiczne (Ryc. 5) [102-103].



Ryc. 5 Strategia „step-up” leczenia choroby Leśniowskiego-Crohna. 5-ASA – pochodne kwasu 5-aminosalicylowego, GKS – steroidy.

Jak pokazują jednak obserwacje kliniczne, pomimo że wciąż poprawia się jakość opieki nad chorymi z NCHZJ, taka strategia terapeutyczna nie wpływa na omawianą wyżej niekorzystną progresję choroby [104-106]. Pewne nadzieje na zmianę tej tendencji dają wstępne obserwacje, które zapoczątkował Hommes i wsp. Wyniki badania SUTD (ang. *Step-up vs. Top-down trial*) pokazały, że wczesne włączenie leczenia biologicznego u chorych na ch.L-C, jeszcze przed wprowadzeniem steroidoterapii, daje istotnie lepsze efekty terapeutyczne zarówno w obserwacji krótkotrwałej i długofalowej, w porównaniu z klasycznym schematem terapii. Uważa się aktualnie, że wspomniana koncepcja „top-down” leczenia ch.L-C daje szansę na zatrzymanie niekorzystnej progresji choroby [107-109]. Problem ten jest wciąż przedmiotem badań i głównie z uwagi na ten fakt oraz w związku z dużymi kosztami, jakie wiązałyby się z tak powszechnym stosowaniem leków biologicznych, strategia „top-down” nie znajduje aktualnie powszechnego zastosowania na świecie.



Niezaprzeczalnym faktem jest jednak to, że wprowadzenie leków biologicznych zmieniło sposób myślenia lekarskiego odnośnie leczenia pacjentów z NCHZJ i stanowi swego rodzaju przełom w algorytmach postępowania w ch.L-C czy WZJG. Znalazło to swoje odzwierciedlenie w obowiązującej w chwili obecnej koncepcji terapeutycznej, która łączy założenia strategii „*step-up*” i „*top-down*”. Otóż dąży się do wczesnego włączania leków biologicznych, po wstępnej próbie intensywnego standardowego leczenia, u chorych wykazujących czynniki ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby. Do czynników tych zalicza się m.in. [105,110-111]:

- wczesny (< 18 r.ż.) początek choroby,
- przebieg ze zwężeniami, przetokami,
- duża rozległość zmian chorobowych,
- konieczność stosowania steroidów przy pierwszym rzucie choroby,
- palenie tytoniu,
- obecność objawów pozajelitowych.

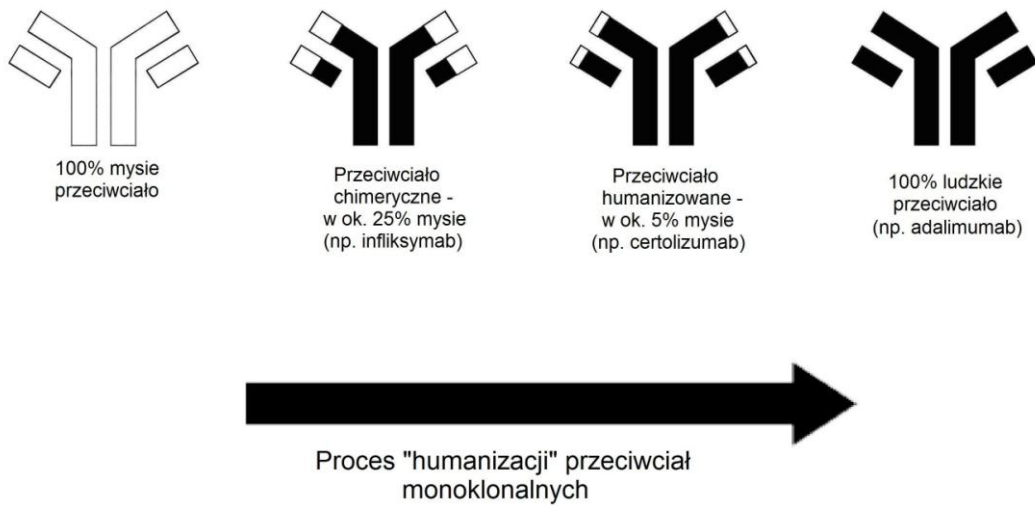
Taką strategię nazwano przyspieszoną strategią „*step-up*” (ang. *accelarated step-up approach*) [112].

#### 1.4.5. Leki biologiczne

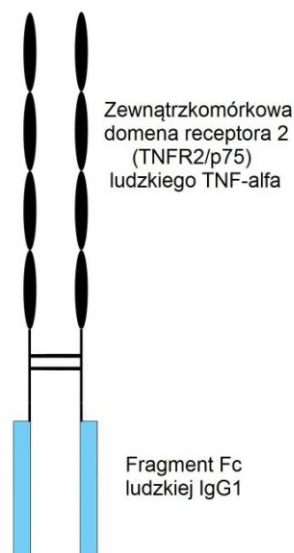
##### 1.4.5.1. Definicja i budowa leków biologicznych

Leki biologiczne to białka, uzyskiwane przy pomocy technik inżynierii genetycznej, ingerujące bezpośrednio w kaskadę zjawisk zachodzących w przebiegu stanu zapalnego. Są to zazwyczaj przeciwciała monoklonalne (Ryc.6) lub receptory wiążące swoiście poszczególne cytokiny lub inne molekuly zaangażowane w proces zapalny (Ryc.7), rzadziej interleukiny, czynniki wzrostu wpływające na konkretne grupy komórek biorące udział w patogenezie danego schorzenia. Znajdują one zastosowanie nie tylko w NCHZJ, ale także m.in. w reumatologii (reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczycowe zapalenie stawów, zeszywniające zapalenie stawów

kręgosłupa), dermatologii (łuszczyca) czy hematologii (leczenie niektórych postaci chłoniaków) [113].



Ryc.6 Rodzaje przeciwciał monoklonalnych – podtyp zależy od udziału w budowie składowej obcogatunkowej (zazwyczaj mysiej).



Ryc. 7 Budowa białka fuzyjnego na przykładzie etanerceptu.

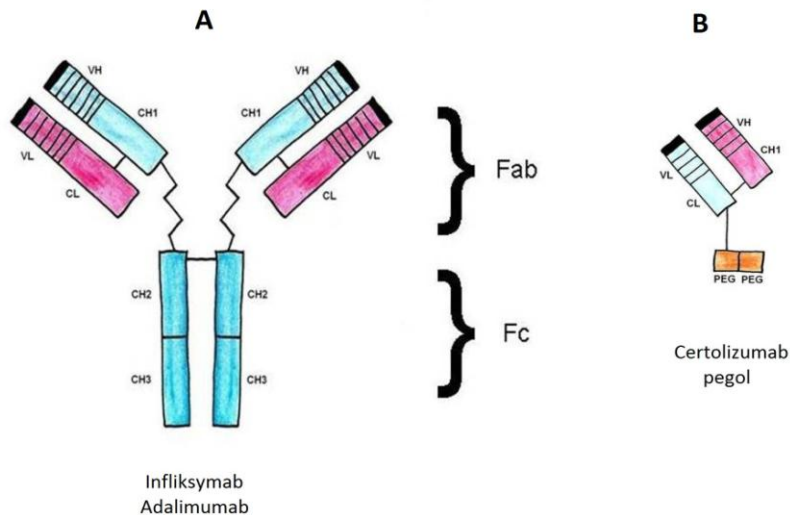
Dotychczas badano przydatność szeregu leków biologicznych w ch.L-C. Jak do tej pory jednak najwięcej korzyści klinicznych i najwięcej badań dotyczy inhibitorów TNF- $\alpha$ . Należy tu wymienić leki takie, jak infliksymab (IFX), adalimumab (ADA) oraz certolizumab-pegol (CER). Białko fuzyjne blokujące tę cytokinę – etanercept (ETA), z uwagi na brak skuteczności, nie znalazło zastosowania w terapii ch.L-C. Budowa leków biologicznych oraz mechanizmy ich działania zostaną więc szczegółowo omówione na przykładzie wymienionych wyżej terapeutyków.

Inhibitory TNF- $\alpha$  to głównie przeciwciała monoklonalne (IFX, ADA), fragmenty przeciwciał (CER) lub białka fuzyjne (ETA). Przeciwciała to białka mające zdolność swoistego wiązania antygeny docelowego, co pozwala na jego inaktywację. Każda immunoglobulina zbudowana jest z 4 łańcuchów polipeptydowych – 2 łańcuchów lekkich L (ang. *light*) oraz 2 łańcuchów ciężkich H (ang. *heavy*), które są ze sobą połączone wiązaniami disiarczkowymi. W obrębie zarówno łańcuchów L jak i H wyróżnia się części zmienne V (znajdują się w odcinkach N-końcowych) i części stałe C (leżące w odcinkach C-końcowych). Istnieje kilka podtypów łańcuchów ciężkich: alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ) i mi ( $\mu$ ). W zależności od rodzaju łańcucha ciężkiego budującego dane przeciwciało dzieli się je na poszczególne klasy – odpowiednio: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Dodatkowe różnice w budowie łańcuchów ciężkich w obrębie danej klasy pozwalają na wyodrębnienie podklas immunoglobulin np. IgG1, IgG2, IgG3 czy IgG4. Łańcuchy lekkie występują natomiast w dwóch odmianach – kappa ( $\kappa$ ) i lambda ( $\lambda$ ). Ponadto w przeciwciałach wyróżniamy dwa fragmenty funkcjonalne: Fab - odpowiedzialny za swoiste wiązanie danego antygeny oraz Fc - pełniący rolę na etapie efektorowym odpowiedzi immunologicznej (m.in. bierze udział w aktywacji układu dopełniacza oraz umożliwia wiązanie się danej immunoglobuliny z komórką efektorową np. makrofagiem) [114].

IFX to monoklonalne, chimeryczne, ludzko-mysie (komponenta ludzka stanowi 75% struktury białka) przeciwciało klasy IgG1 o masie cząsteczkowej 149 kDa. ADA natomiast to immunoglobulina czysto ludzka klasy IgG1 o masie cząsteczkowej odpowiednio 148 kDa. CER jest z kolei humanizowanym fragmentem Fab (czyli w ok. 90% ludzkim) przeciwciała monoklonalnego skoniugowanym z polietylenoglikolem (PEG). Pegylacja wpływa korzystnie na farmakokinetykę leku wydłużając jego okres półtrwania. Natomiast ETA jest białkiem fuzyjnym zbudowanym z części

zewnątrzkomórkowej receptora TNFR2/p75 (ta część wiąże TNF- $\alpha$ ) połączonej z fragmentem Fc immunoglobuliny IgG1 [113-114].

Strukturę poszczególnych leków biologicznych przedstawia rycina nr 8.



Ryc. 8 Budowa inhibitorów TNF- $\alpha$

A – przeciwciało monoklonalne zbudowane jest z dwóch łańcuchów ciężkich (kolor niebieski) - w ich obrębie znajduje się domena zmienna VH oraz domeny stałe CH1, CH2 i CH3 oraz dwóch łańcuchów lekkich (kolor czerwony) – w ich obrębie znajduje się domena zmienna VL i stała CL. Każde przeciwciało monoklonalne posiada fragment wiążący antygen - Fab i fragment Fc – odpowiedzialny za funkcje efektorowe przeciwciała. Inflixymab jest przeciwciałem ludzkim chimerycznym – w 25% składa się z komponenty mysiej, a adalimumab jest przeciwciałem czysto ludzkim.

B – Certolizumab pegol to humanizowany (czyli w ok. 90% ludzki), pegylowany fragment Fab przeciwciała monoklonalnego.

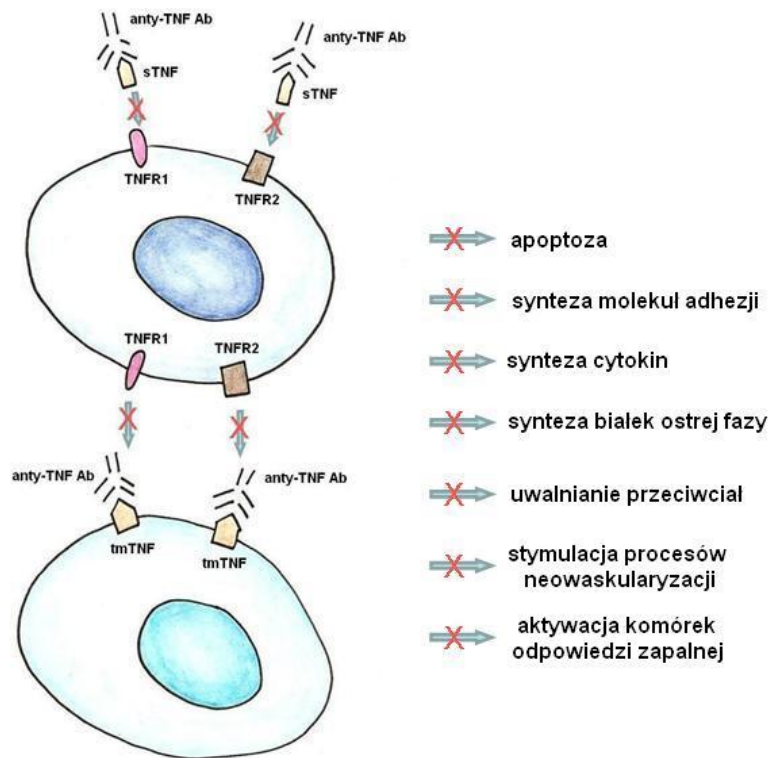
#### 1.4.5.2. Mechanizmy działania inhibitorów TNF- $\alpha$ ze szczególnym uwzględnieniem roli procesu apoptozy

TNF- $\alpha$  jest kluczowym elementem odpowiedzi immunologicznej. Jej plejotropowe działanie obejmuje między innymi indukcję syntezy innych cytokin, pobudzanie uwalniania przeciwciał przez limfocyty B, stymulację produkcji białek ostrej fazy w wątrobie, zwiększenie ekspresji molekuł adhezji na komórkach endotelium czy indukcję apoptozy komórek nowotworowych [115]. Występuje w formie

rozpuszczalnej sTNF (ang. *soluble TNF- $\alpha$* ) i związanej z błoną komórkową tmTNF (ang. *transmembrane TNF- $\alpha$* ). sTNF jest cząsteczką o masie 17 kDa i powstaje w wyniku uwolnienia fragmentu tmTNF (masa cząsteczkowa 26 kDa) z błony komórkowej makrofagów, limfocytów T, komórek NK, a także szeregu innych komórek na skutek działania enzymu konwertującego TNF- $\alpha$  TACE (ang. *TNF- $\alpha$  converting enzyme*) [113]. Zarówno sTNF, jak i tmTNF mają tendencję do formowania homotrimerów. Receptorami, które reagują z sTNF i tmTNF są cząsteczki TNFR1 i TNFR2. TNFR1 znajduje się na większości komórek ludzkiego organizmu i wiąże przede wszystkim sTNF. Ekspresja TNFR2 jest natomiast indukowana w wyniku aktywacji odpowiedzi immunologicznej i obserwowana jest głównie na komórkach krwi i endotelium. Ten typ receptora reaguje w największej mierze z tmTNF, w mniejszym stopniu wiąże sTNF. W tym drugim przypadku opisuje się jednak zjawisko tak zwanego przekazywania liganda (ang. *ligand-passing*) polegające na przeniesieniu interakcji ligand-receptor na inny receptor znajdujący się w pobliżu, do którego dany ligand ma naturalnie większe powinowactwo (sTNF reagujący z TNFR2 „przekazywany” jest sąsiednim receptorom TNFR1) [113,115]. Jak wspomniano wyżej, pobudzenie TNFR prowadzić może do aktywacji komórki, pobudzenia jej do syntezy cytokin, zwiększenia ekspresji molekuł adhezji czy do śmierci komórki w mechanizmie apoptozy. Co ciekawe tmTNF może funkcjonować nie tylko jako ligand reagujący z TNFR, ale też sam może pełnić funkcję receptora [116]. Wówczas rolę liganda odgrywa TNFR lub na przykład przeciwciało anti-TNF- $\alpha$  posiadające zdolność wiązania tmTNF. Zagadnienie to zostanie rozwinięte w dalszej części rozdziału.

Tracey i współpracownicy podzielili mechanizmy działania inhibitorów TNF- $\alpha$  na związane z zablokowaniem reakcji mediowanych poprzez TNFR (brak możliwości połączenia liganda, jakim jest sTNF i/lub tmTNF, a w przypadku ETA także limfotoksyna  $\alpha$  - LT $\alpha$ , z receptorem) oraz na związane z bezpośrednim wpływem leków na tmTNF [113]. Podział ten jest nieco uproszczony i umowny, ponieważ istnieje wciąż bardzo wiele wątpliwości, co do szczegółów zjawisk zachodzących *in vivo*. Najprawdopodobniej wszystkie te mechanizmy są ze sobą w dużej mierze sprzężone, a wielu procesów indukowanych przez leki biologiczne nadal nie umiemy odpowiednio zdefiniować i wytłumaczyć.

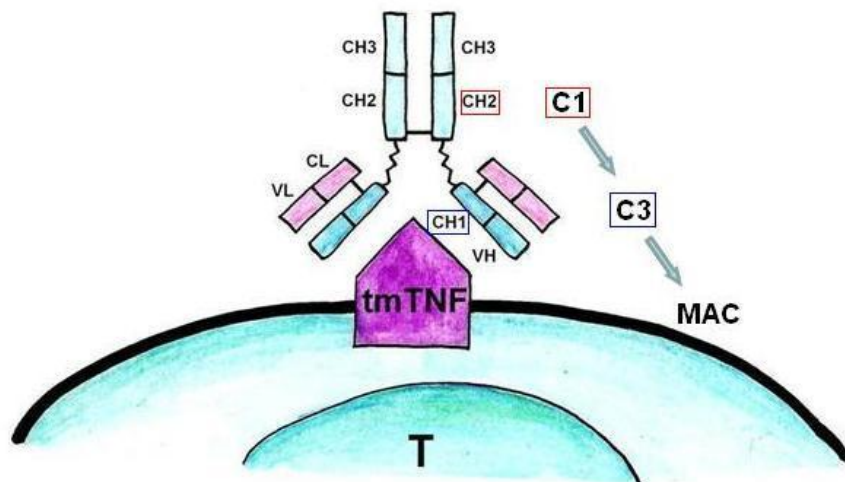
Rycina 9 przedstawia efekty, jakie wywiera zablokowanie sTNF/tmTNF uniemożliwiające tym ligandom połączenie się z TNFR. Skutkiem tego jest brak pobudzenia ścieżek sygnałowych zależnych od aktywacji TNFR.



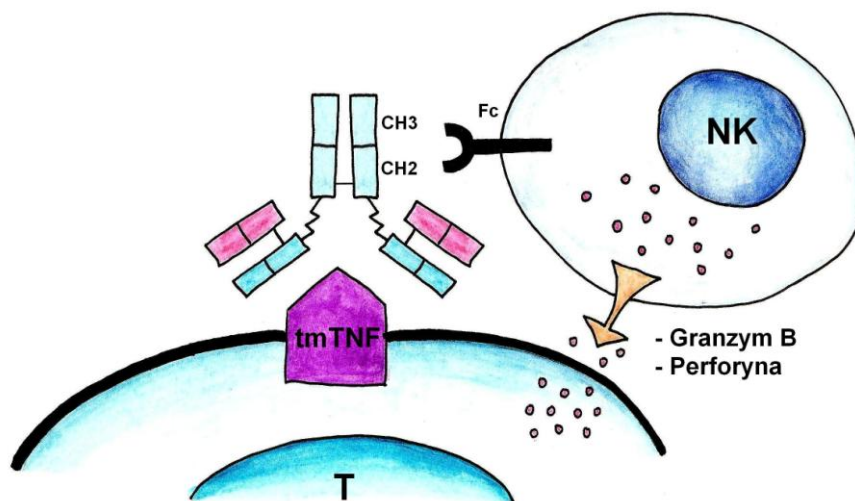
Ryc. 9 Mechanizmy działania inhibitorów TNF- $\alpha$  (anty - TNF Ab) związane z uniemożliwieniem połączenia liganda (rozpuszczalnej i związanej z błoną komórkową formy TNF- $\alpha$  – odpowiednio sTNF i tmTNF) z receptorami (TNFR1 i TNFR2).

Jak wspomniano wyżej tmTNF funkcjonuje nie tylko jako ligand dla receptora TNFR, ale sam może pełnić funkcje receptorowe. Horiuchi i współpracownicy wskazują na co najmniej cztery mechanizmy, w których inhibitory TNF- $\alpha$  modulują odpowiedź immunologiczną reagując bezpośrednio z tmTNF, w tym trzy, które wykorzystują jego funkcje receptorowe [116]. Zaliczamy do nich reakcje cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza CDC (ang. *complement dependent cytotoxicity*) (Ryc.10), reakcje cytotoksyczności zależnej od przeciwciał ADCC (ang. *antibody dependent cell-*

*mediated cytotoxicity*) (Ryc. 11) oraz zjawisko tzw. odwrotnej sygnalizacji komórkowej (ang. *reverse signaling*). We wszystkich spośród tych mechanizmów ligandem pobudzającym receptor tmTNF jest inhibitor TNF- $\alpha$ .



Ryc. 10 Mechanizmy działania inhibitorów TNF- $\alpha$  związane z funkcją receptorową tmTNF – indukcja zjawiska cytotoxyczności zależnej od układu dopełniacza (CDC). Przeciwciało anti-TNF-alfa (anti-TNF Ab) wiążąc się z tmTNF na komórce docelowej może aktywować układ dopełniacza dzięki obecności domeny CH2 w obrębie fragmentu Fc (aktywacja składowej C1 układu dopełniacza). Niezbędną domeną do pełnej aktywacji tej kaskady, z udziałem składowej C3, jest domena CH1 w obrębie fragmentu Fab przeciwciała monoklonalnego. Ostatecznie prowadzi to do uformowania kompleksu atakującego błonę C5b – C9 (ang. *membrane attacking complex – MAC*), co skutkuje zniszczeniem komórki docelowej T (ang. *target cell*).



Ryc. 11 Mechanizmy działania inhibitorów  $TNF-\alpha$  związane z funkcją receptorową tmTNF – indukcja reakcji cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC). Przeciwciało anti-TNF-alfa (anti-TNF Ab) może, po związaniu tmTNF na komórce docelowej, aktywować komórkę NK. Dochodzi do tego w wyniku interakcji domen CH2 i CH3 w obrębie fragmentu Fc przeciwciała z receptorem Fc na komórce NK. Ostatecznie prowadzić to może do indukcji wydzielania granzymu B czy perforyny z komórek NK, co skutkuje zniszczeniem komórki docelowej T (ang. target cell).

Mechanizmem, który wymaga osobnego omówienia jest proces odwrotnej sygnalizacji lub sygnalizacji z zewnątrz – do – wewnątrz (ang. *outside-to-inside signalling*) generowany przez połączenie się inhibitora  $TNF-\alpha$  z receptorem tmTNF [117]. Polega on przede wszystkim na zahamowaniu podziałów komórkowych, supresji wydzielania cytokin oraz na indukcji apoptozy komórki docelowej posiadającej receptor tmTNF. U podstaw tych efektów leży wzbudzenie szeregu wewnątrzkomórkowych szlaków, w których uczestniczą głównie białka z rodziny Bcl-2 (np. Bax, Bak), ponadto obserwuje się wzrost ekspresji białka p21, dochodzi do akumulacji wolnych rodników tlenowych, aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z kinazą JNK oraz zwiększenia stężenia w cytoplazmie jonów wapnia [116-117].

Warto w tym miejscu nieco szerzej przedstawić rolę apoptozy jako jednego z kluczowych mechanizmów molekularnych decydujących o skuteczności inhibitorów  $TNF-\alpha$ . Już pierwsze badania dotyczące wpływu IFX na elementy stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym pokazały, że lek ten istotnie zmniejsza kumulację



komórek nacieku zapalnego w zmienionych zapalnie tkankach [118]. Biorąc pod uwagę sugestie badaczy o roli zaburzeń procesu apoptozy w patogenezie ch.L-C, powstała hipoteza, że inhibitory TNF- $\alpha$  mogą przywracać lokalnie homeostazę komórkową, zwiększając eliminację reaktywnych komórek immunokompetentnych [119-120]. Jak dotąd przeprowadzono kilka badań, które tę hipotezę częściowo potwierdzają. Wykazano m.in., że zarówno w kilkanaście godzin, jak i w kilka tygodni od podania IFX obserwuje się zwiększenie apoptozy LPT w miejscach zmienionych zapalnie [121-123]. Ostatnie doniesienia Kanayamy wsp. (2010r.) pokazują, że spośród dwóch dominujących w ch.L-C typów odpowiedzi immunologicznej – CD4 Th1 i CD4 Th17-zależnej, IFX doprowadza głównie do supresji tej pierwszej w mechanizmie indukcji programowanej śmierci komórkowej elementów szlaku CD4 Th1-zależnego. Innym typem komórek nacieku zapalnego, który podlega eliminacji wskutek zastosowania inhibitora TNF- $\alpha$  są monocyty zarówno w tkance zmienionej chorobowo, jak i w krwi obwodowej [124-126].

Z drugiej strony postuluje się, że zastosowanie przeciwciał anti-TNF- $\alpha$  doprowadza do zmniejszenia ubytków komórek nabłonka i jego regeneracji, co skutkuje uszczelnieniem bariery jelitowej. Jak dotąd jednak dysponujemy skąpyimi danymi, które potwierdzają wpływ zmniejszający nasilenie apoptozy komórek epitelium w ch.L-C w wyniku zastosowania IFX [127-128].

Warto w tym miejscu podkreślić, że wiedza na temat wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na zjawiska apoptozy jest efektem kilku badań, realizowanych na hodowlach komórkowych lub *in vivo* na modelach zwierzęcych. Badania *in vivo* na ludziach obejmują zazwyczaj niewielkie populacje chorych z ch.L-C (średnio w jednym badaniu kilkunastu pacjentów). Ponadto większość danych dotyczących wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na zjawisko apoptozy odnosi się do IFX. Mimo iż uważa się, że ADA ma taki sam potencjał regulujący procesy apoptotyczne oraz, że pozostałe mechanizmy wzbudzone przez ADA są identyczne, jak w przypadku IFX, dysproporcja ilości dotychczasowych analiz w odniesieniu do obu cząsteczek rodzi kolejne pytania o ewentualne różnice między tymi dwoma głównymi lekami antycytokinowymi [113]. Stąd potrzeba kontynuacji analiz w tym zakresie tematycznym.

W podsumowaniu należy zaznaczyć także, że skuteczne zastosowanie w ostatnich latach CER w ch.L-C, częściowo zakwestionowało rolę regulacji apoptozy, jako zasadniczego mechanizmu decydującego o klinicznej efektywności przeciwciał anti-TNF- $\alpha$ . Wynika to z faktu, że pierwsze prace oceniające zdolność CER do wzbudzania programowanej śmierci limfocytów *in vitro* nie wykazały takich właściwości tej molekuly [113,129]. Warto jednak podkreślić, że ostatnie prace Atrei i wsp. zmieniły kolejny raz naszą wiedzę w tym zakresie. Wykazano bowiem, że CER indukuje apoptozę limfocytów CD4 u chorych z ch.L-C, choć efekt ten jest nieco słabszy od IFX i ADA [130]. Chociażby te rozbieżności wyników badań świadczą o pilnej potrzebie kontynuowania badań nad rolą programowanej śmierci komórek i jej zaburzeń w NCHZJ. Na pewno wpływ leków antycytokinowych na proces apoptozy nie jest jedynym mechanizmem działania IFX czy ADA, niemniej jednak nadal uważa się, że odgrywa on kluczową rolę w omawianym aspekcie.

#### 1.4.5.3. Badania kliniczne leków biologicznych i zasady ich stosowania

Leki biologiczne – przede wszystkim IFX i ADA - mają już ugruntowaną pozycję w schematach leczenia ch.L-C, aczkolwiek należy podkreślić, że wciąż są lekami nowymi, stosowanymi powszechnie w gastroenterologii zaledwie od kilku lat. IFX po raz pierwszy został zarejestrowany w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej w roku 1998, a w Europie – w 1999r. Rejestracja dotyczy zarówno ch.L-C, jak i WZJG. Natomiast ADA uzyskał rejestrację Komisji Europejskiej Unii Europejskiej w 2007 roku i dotyczy ona w chwili obecnej tylko ch.L-C [131]. W tabeli 1 przedstawiono wykaz najważniejszych badań klinicznych, które dotyczyły obu leków.

Tabela 1. Badania kliniczne IFX oraz ADA.

<b>Infliksymab</b>	<b>Adalimumab</b>
Badania Targana i wsp. (1997r.)	CLASSIC I (ang. <i>Clinical Assessment of Adalimumab Safety and Efficacy Studied as Induction Therapy in Crohn's Disease</i> )
ACCENT I (ang. <i>A Crohn's Disease Clinical Trial Evaluating Infliximab In a New Long-term Treatment Regimen</i> )	CLASSIC II
ACCENT II	CHARM (ang. <i>Crohn's Trial of The Fully Human Antibody Adalimumab for Remission Maintenance</i> )
SUTD (ang. <i>Step-up vs Top-down trial</i> )	GAIN (ang. <i>Gauging Adalimumab Efficacy in Infliximab Nonresponders</i> )
SONIC (ang. <i>The Study of Biologic and Immunomodulator Naïve Patients in Crohn' Disease</i> )	ADHERE (ang. <i>Additional Long-Term Dosing with HUMIRA to Evaluate Sustained Remission and Efficacy in Crohn's Disease</i> )
ACT I (ang. <i>The Active Ulcerative Colitis Trial</i> )	EXTEND (ang. <i>Extend The Safety and Efficacy of Adalimumab Through Endoscopic Healing</i> )
ACT II	
UC-SUCCESS	

Wyniki wymienionych wyżej badań potwierdzają jednoznacznie przydatność IFX i ADA w leczeniu ch.L-C oraz WZJG (rejestracja ADA do stosowania w WZJG jest w trakcie). Szczególnie dotyczy to postaci odpornej na standardowe leczenie i/lub przypadków nietolerancji lub działań niepożądanych dotychczas prowadzonej terapii [132-155].

W Polsce leczenie biologiczne jest realizowane w ramach Programu Terapeutycznego Narodowego Funduszu Zdrowia. Kwalifikacja chorych, sposób

dawkowania leków oraz zasady nadzoru nad chorymi prowadzone są zgodnie ze ściśle ustalonymi kryteriami. Wynikają one z jednej strony z wytycznych NFZ, z drugiej - są efektem wypracowanych w poszczególnych jednostkach leczniczych i opartych na europejskich algorytmach zasad postępowania [62,64,156]. Szczegóły zawarte są w rozdziale 3 (Materiał i metody).

*Fragmety rozdziału 1 niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w:*

1. Eder P, Łykowska-Szuber L, Linke K. Podstawy molekularne leczenia biologicznego. W: Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii. Adamski Z, Linke K, Samborski W red. Poznań, Termedia Wydawnictwo Medyczne, 2010: 13-31.
2. Eder P, Łykowska-Szuber L, Stawczyk-Eder K, Kreła-Kaźmierczak I, Linke K. Mechanizmy działania inhibitorów czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$ . *Przegląd Gastroenterologiczny* 2011; 6: 290-9.

## 2. Założenia i cele pracy

Leczenie biologiczne z zastosowaniem przeciwciał anty-TNF- $\alpha$  stanowi istotny postęp w terapii ch.L-C. Wciąż jednak niewiele jest badań dotyczących mechanizmów decydujących o skuteczności tej grupy leków bądź jej braku. Lepsze poznanie tych mechanizmów pozwoliłoby nie tylko na zrozumienie podstaw molekularnych efektywności przeciwciał anty-TNF- $\alpha$ , ale także poszerzyłoby wiedzę na temat patogenezы ch.L-C. Wydaje się, że jednym z kluczowych zaburzeń na poziomie komórkowym, stwierdzanym w tej jednostce chorobowej, jest dysfunkcja procesu apoptozy. Przeprowadzone dotychczas analizy pokazują także, że to właśnie wpływ regulujący na programowaną śmierć komórkową jest jednym z potencjalnych mechanizmów działania inhibitorów TNF- $\alpha$ . Nadal jednak badań w tym zakresie jest niewiele, szczególnie brakuje badań na pacjentach chorujących na ch.L-C.

Cele pracy:

- a) ocena nasilenia zjawiska apoptozy i ekspresji białek uczestniczących w tym procesie w limfocytach blaszki właściwej oraz nabłonku jelita grubego u chorych z ch.L-C w porównaniu z jelitem zdrowym,
- b) ocena wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na nasilenie apoptozy w nabłonku oraz limfocytach blaszki właściwej błony śluzowej jelita grubego w ch.L-C poprzez analizę ekspresji aktywnej kaspazy 3,
- c) ocena wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na ekspresję kluczowych białek zaangażowanych w indukcję szlaku zewnątrzpochodnego (Fas, TNFR1) i wewnątrzpochodnego (Bax, Bcl-2) apoptozy w nabłonku i limfocytach blaszki właściwej błony śluzowej jelita grubego u chorych z ch.L-C,
- d) odniesienie ekspresji wymienionych wyżej białek do skuteczności leczenia ch.L-C z zastosowaniem terapii anty-TNF- $\alpha$ ,
- e) ocena wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na aktywność mikroskopową ch.L-C (nasilenie stanu zapalnego), ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów CD4 i CD8,

- f) porównanie ekspresji wymienionych wyżej białek w tkankach zmienionych i niezmiennych zapalnie,
- g) porównanie w omawianym aspekcie infliksymabu i adalimumabu.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Pacjenci

Do badania włączano chorych z rozpoznaną ch.L-C leczonych biologicznie przeciwciałami anty-TNF- $\alpha$  w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od 01.2009r. do 02.2011r. Diagnoza była postawiona na podstawie objawów klinicznych oraz wyników badań dodatkowych (badanie endoskopowe, rezonans magnetyczny oraz enterografia rezonansu magnetycznego, tomografia komputerowa), w tym także na wyniku badania histopatologicznego bioptatów pobranych w trakcie endoskopii lub materiału operacyjnego w przypadku chorych poddanych zabiegom chirurgicznym (odcinkowe resekcje przewodu pokarmowego).

Do kryteriów włączenia chorych do badania należały:

- a) Wiek  $\geq$  18 lat,
- b) Umiarkowana lub ciężka, czynna postać ch.L-C, nieodpowiadająca na dotychczas stosowane leczenie, z uwzględnieniem stosowania w pełnych dawkach leków z grupy 5-aminosalicylanów, steroidów (w tym stwierdzenie steroidooporności lub steroidozależności), azatiopryny, 6-merkaptopuryny, metotreksatu lub antybiotyków w przypadku postaci ch.L-C z obecnością przetok lub ciężka czynna postać ch.L-C, której leczenie jednym lub więcej z wyżej wymienionych leków jest niemożliwe z uwagi na działania niepożądane tych leków lub ich nietolerancję przez chorego (np. reakcje uczuleniowe, hepatotoksyczność, toksyczny wpływ na szpik kostny itd.),
- c) Obecność zmian zapalnych w jelicie grubym, co umożliwiało pobranie zmienionej zapalnie tkanki w trakcie kolonoskopii do analizy histologicznej,
- d) Brak konieczności podjęcia leczenia operacyjnego.

Chorzy ci, z uwagi na wyczerpanie się dalszych możliwości skutecznego leczenia farmakologicznego, kwalifikowani byli do programu leczenia biologicznego z zastosowaniem IFX lub ADA. Decyzja o wyborze leku podejmowana była w oparciu o przeanalizowanie danych dotyczących dotychczasowego przebiegu

choroby u danego pacjenta przez zespół kwalifikujący pacjentów do leczenia biologicznego w Klinice Gastroenterologii w Poznaniu oraz po uwzględnieniu preferencji chorego (lek dożylny vs podskórny, iniekcje co 8 tygodni vs co 2 tygodnie itp.).

W momencie włączenia leczenia biologicznego każdy z włączonych do analizy będącej przedmiotem niniejszej pracy pacjentów był leczony stałymi, maksymalnymi dawkami tolerowanych przez siebie leków. Tzn. dawką 4g na dobę mesalazyny przez okres co najmniej 12 tygodni przed momentem włączenia leczenia biologicznego, steroidami w dawce dobowej 8mg w przeliczeniu na metylprednizolon lub większej przez okres co najmniej 4 tygodni przed włączeniem leczenia biologicznego, azatiopryną w dawce 2-2,5mg/kg masy ciała przez okres co najmniej 3 miesięcy przed momentem włączenia leczenia biologicznego, probiotykiem w dawce terapeutycznej zalecanej przez producenta przez okres co najmniej 3 tygodni przed momentem włączenia leczenia biologicznego. Dopuszczalne było także stosowanie u danego pacjenta w przeszłości przeciwciała anty-TNF- $\alpha$ , ale w okresie co najmniej 18 miesięcy od momentu obecnej kwalifikacji do leczenia biologicznego.

Każdy z pacjentów przechodził standardowy cykl badań kwalifikujących do programu leczenia biologicznego, który obejmował ocenę stanu klinicznego z wyliczeniem indeksu aktywności ch.L-C CDAI (ang. *Crohn's Disease Activity Index*). Indeks ten, opracowany przez Besta i wsp., uwzględnia ocenę 8 zmiennych w okresie ostatnich 7 dni (Tabela 2) [157]. Stwierdzenie CDAI < 150 pkt. oznacza remisję choroby, między 150 a 220 – łagodny przebieg schorzenia, 220-450 umiarkowany rzut choroby, >450 – ciężki przebieg ch.L-C.



Tabela 2. Indeks aktywności klinicznej ch. L-C CDAI (*Crohn's Disease Activity Index*)

Oceniany parametr	Punktacja	Mnożnik
Liczba luźnych wypróżnień (suma z 7 dni)	Ilość luźnych stolców	X 2
Ból brzucha (w ciągu 7dni)	0: brak 1: lekki 2: umiarkowany 3: ciężki	X 5
Ogólne samopoczucie (ocena z 7 dni)	0: dobre 1: nieco obniżone 2: obniżone 3: znacznie obniżone 4: złe	X 7
Powikłanie spoza przewodu pokarmowego (1 punkt za każde powikłanie)	Zapalenie/ból stawów Zapalenie błony naczyniowej oka Rumień guzowaty Zgorzelinowe zapalenie skóry Aftowe zapalenie jamy ustnej Szczelina, przetoka, ropień okołoodbytowy Inna przetoka Temperatura ciała > 37,8°C	X 20
Konieczność stosowania leków zapierających	0: nie 1: tak	X 30
Wyczuwalny guz w jamie brzusznej	0: nie 2: wątpliwe 5: pewne	X 10
Hematokryt (HCT) – różnica między HCT badanym a HCT należnym	Kobiety: 42 - badany HCT Mężczyźni: 47 – badany HCT	X 6
Masa ciała badana w odniesieniu do masy należnej dla wieku i płci	[1-(aktualna/należna masa ciała)] x 100	X 1

Poza wyliczeniem CDAI wykonywano także rutynowe badania laboratoryjne, obejmujące przede wszystkim ocenę w zakresie biochemicznych wykładników aktywności procesu zapalnego (m.in. ocena stężenie białka C-reaktywnego – CRP, odczyn Biernackiego (OB.), morfologia krwi obwodowej, stężenie fibrynogenu itp.). Dodatkowo u każdego chorego przeprowadzano kolonoskopię z oceną aktywności endoskopowej ch.L-C z wykorzystaniem skali SES-CD (ang. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*) wraz z pobraniem wycinków do badania histopatologicznego [158]. Skala SES-CD obejmuje ocenę obecności, rozmiaru oraz zasięgu owrzodzeń, zasięgu powierzchni jelita ze zmianami zapalnymi oraz obecności zwężeń w każdym z badanych segmentów jelita grubego. Charakterystykę skali przedstawia tabela 3.

Tabela 3. SES-CD (*Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*) – skala oceny endoskopowej aktywności ch.L-C

<b>Obecność owrzodzeń i ich rozmiary</b>	<b>Rozległość owrzodzeń w danym fragmencie jelita</b>	<b>Zasięg i rozległość zmian chorobowych</b>	<b>Obecność zwężeń</b>
Brak <b>0 pkt.</b>	Brak <b>0 pkt.</b>	Brak <b>0 pkt.</b>	Brak <b>0 pkt.</b>
Owrzodzenie o max średnicy 0,1 – 0,5cm <b>1 pkt.</b>	<10% danego odcinka jelita <b>1 pkt.</b>	<50% danego odcinka jelita <b>1 pkt.</b>	Pojedyncze zwężenie nieutrudniające dalszej penetracji jelita <b>1 pkt.</b>
Owrzodzenie o max średnicy 0,5 – 2,0 cm <b>2 pkt.</b>	10-30% danego odcinka jelita <b>2 pkt.</b>	50-75% danego odcinka jelita <b>2 pkt.</b>	Mnogie zwężenia jelita nieutrudniające dalszej penetracji jelita <b>2 pkt.</b>
Owrzodzenie o max średnicy > 2 cm <b>3 pkt.</b>	>30% danego odcinka jelita <b>3 pkt.</b>	>75% danego odcinka jelita <b>3 pkt.</b>	Każde zwężenie uniemożliwiające dalsze badanie <b>3 pkt.</b>

Diagnostykę uzupełniano w większości przypadków o badania obrazowe (przede wszystkim enterografia rezonansu magnetycznego). U każdego chorego wykluczano obecność utajonego lub aktywnego procesu gruźliczego (zdjęcie rtg klatki piersiowej, próba tuberkulinowa i/lub QuantiFeron TBGold) lub innej infekcji, która mogłaby być

przeciwwskazaniem do wdrożenia leczenia biologicznego (m.in. wykluczenie zakażenia wirusem HBV, HCV, HIV, a w wybranych przypadkach, jeśli istniały przesłanki kliniczne, infekcji wirusem cytomegalii, rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego, infestacji pasożytniczej itp.).

Następnie, po zakwalifikowaniu do leczenia, pacjenci otrzymywali IFX lub ADA w ramach tzw. leczenia indukującego remisję (leczenie indukcyjne) zgodnie z, przyjętymi na całym świecie i akceptowanymi przez Polskie Towarzystwo Gastroenterologii, *European Crohn's and Colitis Organisation* - ECCO oraz Narodowy Fundusz Zdrowia w Polsce, schematami. Leczenie to obejmuje podanie 3 dawek IFX 5mg/kg masy ciała w odstępach czasowych 0 – 2 – 6 tygodni we wlewach dożylnych. W przypadku adalimumabu schemat ten przedstawia się następująco: 160mg podskórnie w tygodniu 0 oraz 80mg w tygodniu 2, kolejne 5 dawek po 40mg w odstępach 2-tygodniowych.

W trakcie leczenia indukcyjnego chorzy pozostawali w ścisłym nadzorze zespołu zajmującego się leczeniem biologicznym w Klinice Gastroenterologii w Poznaniu - kontrolowany był ich stan somatyczny oraz wykonywano kontrolne badania laboratoryjne. Każda modyfikacja prowadzonego leczenia farmakologicznego równolegle z stosowanym leczeniem biologicznym była konsultowana z tym zespołem. Z analizy wykluczono pacjentów, u których w sposób istotny zmodyfikowano dotychczas prowadzone leczenie farmakologiczne. Dopuszczalne było jedynie stopniowe redukowanie dawki steroidu po podaniu 2 pierwszych dawek IFX lub 4 pierwszych dawek ADA w tempie 2mg/tydzień w przeliczeniu na metylprednizolon. Pozostałe leki przyjmowane były w stałych, niezmiennych dawkach.

Po zakończeniu leczenia indukcyjnego chorzy przyjmowani byli do Kliniki celem oceny skuteczności terapii. W przypadku IFX następowało to w 10 tygodniu od momentu rozpoczęcia terapii, a w przypadku ADA – w 13 tygodniu od rozpoczęcia leczenia. Ocena kontrolna obejmowała ocenę stanu klinicznego z oszacowaniem aktywności choroby w skali CDAI, wykonanie kontrolnych badań laboratoryjnych, kontrolne badanie endoskopowe z oceną aktywności endoskopowej ch. L-C (skala SES-CD) oraz pobraniem wycinków do badania histopatologicznego, a także ew.

uzupełnienie diagnostyki o kontrolne badania obrazowe (przede wszystkim o enterografię rezonansu magnetycznego). Chorzy, którzy odpowiedzieli na terapię indukcyjną, kwalifikowani byli do tzw. leczenia podtrzymującego, które obejmowało kolejne wlewy IFX co 8 tygodni lub kolejne iniekcje ADA co 2 tygodnie aż do roku od momentu rozpoczęcia terapii.

Za kryteria definiujące uzyskanie odpowiedzi na leczeniu indukcyjnym uznano obecność tzw. głębokiej remisji (ang. *deep remission*), tj. remisji klinicznej (CDAI < 150 pkt.) oraz efektu gojenia się błony śluzowej (ang. *mucosal healing*), definiowanego jako aktywność endoskopowa w skali SES-CD  $\leq 5$  pkt [159-160].

### 3.2. Materiał tkankowy i stosowane odczynniki

Materiał tkankowy wykorzystany w niniejszej pracy stanowiły biopaty jelita grubego pobierane w trakcie kolonoskopii przed włączeniem leczenia biologicznego oraz po zakończeniu terapii indukcyjnej. Materiał pobierano u wszystkich chorych z miejsc zmienionych zapalnie przed leczeniem oraz z tej samej lokalizacji w obrębie jelita grubego po leczeniu indukcyjnym. W przypadku 5 pacjentów, spośród chorych, którzy nie odpowiedzieli na leczenie i zostali poddani leczeniu chirurgicznemu (resekcje zmienionych zapalnie odcinków przewodu pokarmowego), jako materiał tkankowy po leczeniu indukcyjnym posłużył materiał operacyjny. Dodatkowo u części chorych (n=15) pobierano także materiał biopsyjny przed i po leczeniu biologicznym z miejsc niezmiennych zapalnie. Materiał kontrolny (n=10) stanowiła zdrowa tkanka jelita grubego pobrana z obrzeża tkanki resektowanej z powodu raka jelita grubego oraz biopaty zdrowej tkanki jelita grubego pobierane u osób bez objawów ze strony przewodu pokarmowego, u których wykonywano kontrolną kolonoskopię w ramach nadzoru po polipektomii.

Wszystkie tkanki zostały utrwalone w roztworze zbuforowanej 10% formaliny, następnie zatopione w parafinie i skrojone na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$  oraz umieszczone na szkiełkach podstawowych SuperFrost/Plus.

Skrawki parafinowe zostały poddane następującym badaniom:

- Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)
- Reakcje immunocytochemiczne z wykorzystaniem następujących przeciwciał:

Przeciwciało	Wykrywany marker	Typ przeciwciała, rozcieńczenie, producent
Anty-aktywna Kaspaza 3	Aktywna postać kaspazy 3	Poliklonalne, królicze, 1µg/ml, R&D Systems
Anty-Bcl-2	Bcl-2	Monoklonalne, mysie, 1:500, Dako
Anty-Bax	Bax	Monoklonalne, królicze, 1:2000, Dako
Anty-TNFR1	TNFR1	Poliklonalne, królicze, 1:2000, Abcam
Anty-Fas (CD95)	Fas (CD95)	Monoklonalne, mysie, 1:200, Leica Microsystem
Anty-CD4	CD4	Monoklonalne, mysie, 1:200, Dako
Anty-CD8	CD8	Monoklonalne, mysie, 1:300, Dako

Dla porównania ekspresji badanych białek w komórkach nabłonka jelita grubego oraz limfocytach blaszki właściwej błony śluzowej jelita grubego u chorych z ch.L-C, identyczne badania wykonywano w materiale tkankowym stanowiącym kontrolę pozytywną dla stosowanych odczynników. W przypadku Bax, Bcl-2 i TNFR1 był to rak gruczołowy piersi, aktywnej kaspazy 3 – rak płaskonabłonkowy skóry, a w przypadku Fas (CD95), CD4 i CD8 – reaktywny węzeł chłonny (Fot.52-53). Materiał ten uzyskano z Zakładu Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Badania w grupie kontrolnej pozytywnej miały na celu jedynie

weryfikację jakości stosowanych przeciwciał i nie były poddane badaniom ilościowym ani analizie statystycznej [161].

### 3.3. Metody badań

#### 3.3.1. Barwienie H+E i ocena aktywności mikroskopowej choroby

Barwienie hematoksyliną i eozyną przeprowadzono w sposób rutynowy w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. med. Przemysław Majewski). Następnie zabarwione skrawki poddane zostały ocenie histopatologicznej przez doświadczonego patomorfologa w zakresie aktywności stanu zapalnego w badanym materiale. Do oceny aktywności mikroskopowej posłużono się zmodyfikowaną skalą zaproponowaną przez D'Haensa i wsp [162]. Skala ta obejmuje ocenę 8 parametrów histologicznych przedstawionych w tabeli 4.

Tabela 4. Skala oceny aktywności histologicznej ch.L-C wg D'Haens i wsp [162].

Oceniony parametr histologiczny	Punktacja
Uszkodzenie nabłonka	0 - bez odchyłeń 1 - ogniskowe 2 - rozległe
Zmiany architektoniki	0 - bez odchyłeń 1 - dotyczą < 50% bioptatu 2 - dotyczą > 50% bioptatu
Komórki mononuklearne w blaszce właściwej błony śluzowej	0 - prawidłowa ilość 1 - umiarkowane zwiększenie liczebności 2 - znaczące zwiększenie liczebności

Komórki polimorfonuklearne w blaszce właściwej błony śluzowej	0 - prawidłowa ilość 1 - umiarkowane zwiększenie liczebności 2 - znaczące zwiększenie liczebności
Neutrofile w nabłonku	0 - brak 1 - na powierzchni nabłonka 2 - zapalenie krypt 3 - ropnie kryptowe
Nadżerki lub owrzodzenia	0 - brak 1 - obecne
Ziarniniak sarkoidalny	0 - brak 1 - obecny
Liczba zajętych procesem chorobowym biopsji	0 - brak 1 - < 33% 2 - 33 – 66% 3 - > 66%

Każdy z parametrów oceniany był w badanym bioptacie, będącym przedmiotem dalszych analiz immunocytochemicznych. Natomiast ocena liczby zajętych procesem chorobowym biopsji możliwa była dzięki faktowi, że u każdego chorego pobierano także rutynowo biopsje ze wszystkich badanych w trakcie kolonoskopii odcinków przewodu pokarmowego (tj. kątnica i wstępnicą, poprzecznica, zstępnicą, esicą i odbytnicą). Ostateczny wynik w stosowanej skali stanowił sumę punktów przyznanych po ocenie każdego ze wskazanych parametrów; maksymalny wynik wynosił 16 punktów.

### 3.3.2. Technika immunocytochemiczna ABC

Reakcje immunocytochemiczne ABC wg Hsu i wsp. przeprowadzano w następujący sposób [163-164]:

1. Odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (2 x ksylen, alkohol + ksylen, 2 x alkohol 100%, następnie alkohol 95%, 90%, 80%, 70%).
2. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut.
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 30 minut (Dako REAL HRP Blocking Solution, DAKO).
4. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut.
5. Płukanie w wodzie destylowanej – 5 minut.
6. Inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, Dako) – 30 minut.
7. Inkubacja ze swoistymi przeciwciałami – 18 godzin/4°C, a następnie przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej
8. Płukanie w roztworze soli fizjologiczne zbuforowanej fosforanami (PBS) – 3 x 3 minuty.
9. Inkubacja w roztworze zawierającym dekstran koniugowany z peroksydazą i wtórne przeciwciała kozie przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim (Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse, Dako) – 30 minut.
10. Płukanie w PBS-ie – 3 x 3 minuty.
11. Inkubacja z 3-3'diaminobenzydyną (Dako REAL DAB, Dako) – 5-7 minut.
12. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut.
13. Podbarwienie hematoksyliną – 1-2 minut.
14. Płukanie w wodzie bieżącej – 5 minut.
15. Przeplukanie w wodzie destylowanej.



16. Odwodnienie preparatów w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 90%, 95%, 2 x 100%), w mieszaninie alkoholu 100% i ksylenu oraz ksylenie.
17. Zamknięcie preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego i szkiełek nakrywkowych.

Dodatkowo przeprowadzano kontrole negatywne, zastępując specyficzne przeciwciała przez surowice odpowiedniego gatunku w roztworze Dako Antibody Diluent, Background Reducing firmy Dako (Fot.54).

Przeciwciała takie, jak anty-Bcl2, anty-Bax, anty-Fas (CD95), anty-TNFR1, anty-CD4 i anty-CD8 wymagały dodatkowego odsłaniania determinant antygenowych za pomocą wysokiej temperatury (HIER – ang. *heat-induced epitope retrieval*). Procedura polegała na zastosowaniu po etapach odparafinowania i nawodnienia dodatkowego etapu gotowania preparatów w roztworze Target Retrieval Solution firmy Dako w kuchence mikrofalowej o mocy 700W przez 12 minut. Następnie preparaty płukano w PBS-ie i od punktu 3 prowadzono reakcję według standardowej procedury.

Reakcje immunocytochemiczne wykonywane były w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel).

#### 3.4. Ocena ekspresji białek i analiza statystyczna

##### 3.4.1. Półilościowa ocena ekspresji białek

Do oceny reakcji immunocytochemicznych na wykrywanie białek cytoplazmatycznych (kaspaza-3, Bcl-2, Bax) wykorzystano 12-punktową, półilościową skalę IRS (*Immunoreactive Score*) według Remmele i Stegner [165]. Oceniano liczbę komórek z pozytywną reakcją (PP – *percentage of positive cells*) oraz nasilenie reakcji (SI – *staining intensity*) w co najmniej 10 polach widzenia mikroskopu świetlnego Olympus B-2 przy oryginalnym powiększeniu 40x. Iloczyn PP i SI stanowił wartość końcową ocenianej reakcji, a ostateczny wynik ustalano biorąc pod uwagę średnią wartość z 10 pól widzenia (Tabela 5).

Tabela 5. Skala IRS (Immunoreactive Score) wg Remmele i Stegner [165].

PP – liczba komórek immunopozytywnych	SI – intensywność reakcji
0: brak komórek z pozytywną reakcją	0: brak reakcji barwnej
1: do 10% komórek z pozytywną reakcją	1: słabo nasilona reakcja barwna
2: 11-50% komórek z pozytywną reakcją	2: średnio nasilona reakcja barwna
3: 51-80% komórek z pozytywną reakcją	3: intensywna reakcja barwna
4: >80% komórek z pozytywną reakcją	
<b><u>PP x SI</u></b>	
<u>Końcowa wartość równa:</u>	
1-2 - reakcja słaba;	
3-5 - reakcja średnio nasilona;	
6-12 – intensywna reakcja immunocytochemiczna	

W przypadku białek o ekspresji błonowej (CD4, CD8, Fas, TNFR1) posłużono się półilościową, 3-stopniową zmodyfikowaną skalą HercepTest™, zaprojektowaną do oceny ekspresji białka HER2 w preparatach biopsyjnych raka żołądka (Tabela 6) [166-167]. Bierze ona pod uwagę ilość komórek immunopozytywnych w badanym preparacie oraz intensywność reakcji. Ostateczny wynik stanowi średnia wartość ekspresji białek oceniona w 10 polach widzenia przy powiększeniu oryginalnym 40x.

Tabela 6. Skala HercepTest™ [166-167]

Wynik	Reakcja barwna
0	Brak reakcji lub reakcja barwna w mniej niż 5 komórkach
1 +	Słaba, niekompletna reakcja barwna obecna w co najmniej 5 komórkach
2 +	Słaba, kompletna reakcja do średnionasilonej reakcji barwnej w co najmniej 5 komórkach
3 +	Silna reakcja barwna w co najmniej 5 komórkach

Ekspresję kaspazy-3, Bax, Bcl-2, TNFR1 i Fas (CD95) oceniano w komórkach nabłonka jelita grubego – ocena dotyczyła całości nabłonka jelita grubego w danym preparacie, oraz osobno dokonano oceny ekspresji białek w nabłonku powierzchniowym oraz nabłonku krypt. Dodatkowo oceniano ekspresję wymienionych wyżej białek oraz CD4 i CD8 w komórkach blaszki właściwej błony śluzowej, w tym przede wszystkim w limfocytach.

#### 3.4.2. Analiza statystyczna

Wyniki badań zweryfikowano testem Shapiro-Wilka pod kątem zgodności z rozkładem normalnym. Jeśli wyniki wykazały zgodność z rozkładem normalnym, wówczas wyniki badań porównywano testami parametrycznymi, w przeciwnym wypadku – testami nieparametrycznymi. Statystyka opisowa oraz różnice statystyczne między wartościami parametrów weryfikowano testem t-Studenta dla prób zależnych lub testem nieparametrycznym Wilcoxon w przypadku niezgodności wyników badań z rozkładem Gaussa. Wyniki grupy badanej porównywano z grupą kontrolną testem t-Studenta dla prób niezależnych lub nieparametrycznym testem Mann'a-Whitney'a w przypadku niezgodności danych z rozkładem Gaussa. W przypadku analizy korelacji - jeśli wyniki badań były zgodne z rozkładem normalnym, wówczas obliczano współczynnik korelacji liniowej Pearson'a, w przeciwnym wypadku, współczynnik korelacji rangowej Spearman'a.

Wyniki analizy przyjęto jako istotne statystycznie jeśli poziom istotności wynosił  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu statystycznego GraphPad Prism v. 5.0.

Badania statystyczne przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek).

#### 3.5. Zagadnienia etyczne

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (uchwała nr 94/09) dnia 05 lutego 2009 roku.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka grupy badanej

W okresie od 01.2009r. do 02.2011r. do leczenia biologicznego zakwalifikowano w Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu 50 osób. Spośród nich kryteria kwalifikujące do udziału w badaniu spełniło 35 pacjentów. U 21 spośród nich uzyskano odpowiedź na leczenie indukcyjne (CDAI<150 oraz SES-CD≤5 czyli tzw. głęboką remisję), co stanowiło 60% grupy badanej (Fot.1-4). 14 chorych (40%) nie odpowiedziało na terapię. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w zakresie wyjściowej aktywności klinicznej (CDAI) oraz endoskopowej (SES-CD) ch.L-C między grupą z odpowiedzią i grupą bez odpowiedzi na terapię. Pacjenci bez odpowiedzi na leczenie wykazywali natomiast wyjściowo znamienne wyższe stężenie CRP (35,7±26 mg/l vs 12,0±12,5 mg/l; p=0.001), ilość płytek krwi - PLT (427±144 tys/mm<sup>3</sup> vs 331±103 tys/mm<sup>3</sup>; p<0.03) oraz fibrynogenu (568±90 mg/dl vs 428±105 mg/dl; p=0.0003) w porównaniu z chorymi z reakcją na leki antycytokinowe. Nie odnotowano znamienych statystycznie różnic w zakresie OB., stężenia erytrocytów (RBC), hemoglobiny (HGB) czy leukocytozy (WBC).

W podgrupie leczonej ADA odpowiedź na leczenie uzyskało 50% chorych (7/14), a w przypadku chorych leczonych IFX odsetek ten wyniósł 66,6% (14/21). Różnica w skuteczności obu leków nie była istotna statystycznie.

Najważniejsze dane charakteryzujące całość badanej grupy przedstawia tabela 7.

Tabela 7. Charakterystyka całej grupy badanej.

<b>Cecha</b>	<b>Cała grupa badana (n=35)</b>
<b><u>Płeć</u></b> Mężczyźni/Kobiety (procentowy udział kobiet)	13/22 (63%)
<b><u>Wiek (lata)</u></b> Średnia ± SD	31±11
<b><u>Czas trwania objawów chorobowych (lata)</u></b> Średnia ± SD	8±4
<b><u>Czas, jaki minął od momentu postawienia diagnozy ch.L-C (lata)</u></b> Średnia ± SD	6±4
<b><u>Lokalizacja zmian chorobowych</u></b>  1. jelito grube 2. jelito cienkie 3. żołądkowo-dwunastnicza 4. przetoki okołodbytowe 5. inne przetoki	35/35 (100%) 25/35 (71%) 1/35 (2%) 10/35 (29%) 4/35 (11%)
<b><u>Typ choroby</u></b>  1. zapalny 2. zapalny + penetrujący 3. pozostałe	20 (57%) 15 (43%) 0 (0%)
<b><u>Wyściowe CRP (mg/l)</u></b> Średnia ± SD	21,4±22
<b><u>Wyściowe SES-CD (pkt.)</u></b> Mediana (95% CI) [min – max]	11 (9-15) [1-33]
<b><u>Przyjmowane leki</u></b>  1. aminosalicylany 2. steroidy 3. azatiopryna 4. antybiotyki 5. probiotyki	35/35 (100%) 14/35 (40%) 29/35 (83%) 11/35 (31%) 34/35 (97%)

4.2. Aktywność mikroskopowa oraz ocena ekspresji białek w grupie badanej w tkankach zmienionych zapalnie przed leczeniem biologicznym.

Mediana aktywności mikroskopowej ch.L-C wynosiła 6,74. U ponad połowy badanych nie stwierdzano w ocenianych bioptatach uszkodzenia nabłonka (n=18; 51,4%), w 4 przypadkach (11,4%) uszkodzenia miały charakter rozlany, w pozostałych (37,2%) – ogniskowy. Zmiany architektoniki dotyczące > 50% badanego bioptatu stwierdzono u 1 chorego, u większości pacjentów (n=26; 74,2%) zmiany te obejmowały < 50% bioptatu, w 8 przypadkach histopatolog nie stwierdził zmian w tym zakresie. U wszystkich chorych rejestrowano zwiększenie liczebności komórek mononuklearnych (limfocyty, makrofagi) w blaszce właściwej błony śluzowej (ang. *lamina propria mononuclear cells* - LPMC), w tym u 8 pacjentów (22,8%) określono je jako znaczne. U większości chorych (n=27; 77,2%) odnotowano także zwiększenie liczebności komórek polimorfonuklearnych (granulocyty). Charakterystycznym zjawiskiem był zwiększony w wielu przypadkach odsetek, obok granulocytów obojętnochłonnych, eozynofilów. U blisko 1/3 chorych nie stwierdzano obecności neutrofilów w obrębie nabłonka, u pozostałych pacjentów (n=19; 45,7%) obserwowano najczęściej pojedyncze granulocyty obojętnochłonne na powierzchni nabłonka lub zapalenie krypt (tzw. cryptitis), a u 6 chorych (17,1%) - ropnie kryptowe. U 16 (45,7%) chorych stwierdzono nadżerki lub owrzodzenia w bioptatach, a w 2 przypadkach (5,7%) – ziarniniaki sarkoidalne (Fot. 5,7).

#### Ekspresja aktywnej kaspazy 3

W większości przypadków ekspresja aktywnej kaspazy 3 w nabłonku, która dotyczyła cytoplazmy komórek, była słaba lub średnio nasiloną, ale była ona istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (zdrowe jelito) zarówno w obrębie nabłonka powierzchownego, nabłonka krypt, jak i w nabłonku ocenianym całościowo. Charakterystycznym zjawiskiem w grupie badanej było lokalne występowanie w tkankach zmienionych zapalnie grup wielu komórek nabłonka w ekspresją aktywnej kaspazy 3 (Fot.17-18), podczas gdy w grupie kontrolnej ekspresja tego białka była bardzo słaba i dotyczyła zazwyczaj pojedynczych komórek nabłonka powierzchownego.

W przypadku limfocytów blaszki właściwej (ang. *lamina propria lymphocytes* - LPL) ekspresja aktywnej kaspazy 3 w grupie badanej była bardzo słaba lub nie rejestrowano jej wcale (Fot.17). Pozostawało to w kontraście do zjawisk obserwowanych w grupie kontrolnej, gdzie rejestrowano obecność aktywnej kaspazy 3 w cytoplazmie LPL w pojedynczych komórkach z zazwyczaj silnym nasileniem reakcji, a różnica ta była znamienista statystycznie.

#### Ekspresja Bcl-2

Białko Bcl-2 było obecne jedynie w pojedynczych komórkach nabłonka jelita grubego i charakteryzowało się słabą ekspresją. Dotyczyło to zarówno grupy badanej jak i kontrolnej, jednak ilość komórek Bcl-2-pozytywnych była istotnie większa w grupie kontrolnej w nabłonku kryptowym oraz całości nabłonka, nie odnotowano natomiast istotnych różnic w zakresie nabłonka powierzchniowego. W przypadku LPL wśród pacjentów charakterystyczna była intensywna reakcja cytoplazmatyczna dotycząca większości komórek, intensywną ekspresję Bcl-2 rejestrowano także w innych komórkach nacieku zapalnego w obrębie blaszki właściwej śluzówki (neutrofile, eozynofile) (Fot.24). W zdrowej tkance jelita obserwowano także obecność Bcl-2 w wielu LPMC oraz granulocytach, intensywność reakcji była jednak zazwyczaj średnia, a całkowita ekspresja Bcl-2 oceniana w skali IRS była istotnie niższa w porównaniu z chorymi na ch.L-C ( $p < 0.0001$ ).

#### Ekspresja Bax oraz ocena indeksu Bax/Bcl-2 w LPL

Białko Bax było obecne w cytoplazmie komórek nabłonka jelita grubego u wszystkich pacjentów oraz w całej grupie kontrolnej, a nasilenie reakcji było intensywne (Fot.30-32). Zarówno w przypadku nabłonka krypt, jak i całości nabłonka odnotowano różnice statystyczne między obiema grupami z istotnie wyższą ekspresją wśród chorych z ch.L-C. Nie odnotowano takich różnic natomiast, gdy brano pod uwagę tylko nabłonek powierzchniowy.

Ekspresja Bax w LPL miała także charakter cytoplazmatyczny, w obu grupach (chorzy vs kontrola) reakcja charakteryzowała się przeważnie średnią intensywnością, ale była istotnie niższa w tkankach zmienionych chorobowo ( $p < 0.001$ ). Podobnie indeks Bax/Bcl-2 w LPL był istotnie niższy wśród pacjentów z ch.L-C ( $p < 0.0001$ ) (Fot.32).

Podobny, do LPL, charakter i nasilenie ekspresji Bax obserwowano także w innych komórkach nacieku zapalnego w obrębie *lamina propria* błony śluzowej (głównie w neutrofilach i eozynofilach).

#### Ekspresja Fas

U wszystkich chorych, a także w całej grupie kontrolnej stwierdzano obecność białka Fas w obrębie komórek nabłonka jelita grubego (Fot.36). Fas zlokalizowane było głównie błonowo (przede wszystkim w częściach podstawno-bocznych) większości komórek, intensywność reakcji była zazwyczaj słaba. Nie stwierdzono różnic w zakresie ekspresji Fas w obrębie całości nabłonka, jedynie w obrębie nabłonka krypt ekspresja tego białka była istotnie wyższa w jelicie zdrowym ( $p < 0.001$ ).

W przypadku LPL Fas lokalizowano głównie błonowo, nie można jednak było również wykluczyć lokalizacji błonowo-cytoplazmatycznej (Fot.37). Nasilenie reakcji było słabe i dotyczyło w sposób rozproszony zarówno LPL, jak i pozostałych komórek nacieku zapalnego. Nie stwierdzono różnic w ekspresji Fas w LPL pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

#### Ekspresja TNFR1

TNFR1 w epitelium jelita grubego lokalizowano zarówno błonowo (głównie w częściach przypodstawnych komórek), jak i w części przypadków w cytoplazmie. W przypadku pacjentów z ch.L-C intensywność reakcji była słaba, ale dotyczyła większości komórek (Fot.44-45). Całkowita ekspresja TNFR1 w nabłonku powierzchniowym, kryptowym oraz całości nabłonka była istotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu z tkanką zdrową ( $p < 0.003$  dla całości nabłonka).

W LPL w pojedynczych komórkach rejestrowano słabą reakcję błonową oraz błonowo-cytoplazmatyczną na obecność TNFR1 (Fot.45). W grupie kontrolnej natomiast reakcja miała również słabą intensywność, dotyczyła większej liczby LPL, ale całościowa ekspresja TNFR1 w tkance zdrowej nie różniła się znamienne od LPL. W pozostałych komórkach nacieku zapalnego w obrębie blaszki właściwej śluzówki rejestrowano pojedynczo, rzadziej w skupiskach, komórki (przede wszystkim neutrofile i eozynofile) o silnej intensywności głównie cytoplazmatycznej reakcji na obecność TNFR1.



## Ekspresja CD4 i CD8

Zarówno w przypadku CD4, jak i CD8 stwierdzano silną lub rzadziej słabą błonową ekspresję w większości LPL w grupie badanej (Fot.9,13). Ekspresja CD4 była wyższa od CD8 w tkankach zmienionych zapalnie, jak i w zdrowym jelicie (ns). Natomiast obie cząsteczki wykazywały istotnie wyższą ekspresję w biopsjach jelita grubego w grupie chorych w porównaniu z kontrolą (dla CD4  $p < 0.0001$ ; dla CD8  $p < 0.001$ ).

Aktywność mikroskopową i ekspresję białek w całej grupie badanej przed leczeniem oraz w grupie kontrolnej zaprezentowano w tabeli 8 i 9.

Tabela 8 A-D. Średnia aktywność mikroskopowa (AM) oraz ekspresja białek w całej grupie badanej przed leczeniem. AM – aktywność mikroskopowa, K3 – aktywna kaspaza 3, NP – nabłonek powierzchniowy, NK – nabłonek krypt, NC – całość nabłonka, LPL – limfocyty blaszki właściwej..

A)

	AM	K3 NP	K3 NK	K3 NC	K3 LPL	Bcl-2 NP	Bcl-2 NK	Bcl-2 NC	Bcl-2 LPL
Średnia	6,74	3,48	2,21	2,84	0,43	0,29	0,23	0,26	6,61
Odch. std. (SD)	3,42	1,56	1,31	1,26	0,41	0,31	0,26	0,22	2,58
Błąd std. średniej(SEM)	0,60	0,29	0,24	0,23	0,08	0,06	0,05	0,04	0,49
Dolna 95% granica ufności	5,53	2,89	1,71	2,36	0,27	0,17	0,13	0,17	5,61
Górna 95% granica ufności	7,96	4,08	2,71	3,32	0,58	0,41	0,33	0,34	7,61
Minimum	1,5	0,6	0,1	0,45	0	0	0	0	1,5
Mediana	6	3,2	2	2,85	0,3	0,2	0,15	0,2	7,25
Maximum	14	7	5	5,5	2	1,1	1	0,95	11,6

B)

	Bax NP	Bax NK	Bax NC	Bax LPL	FAS NP	FAS NK	FAS NC	FAS LPL
Średnia	8,71	6,89	7,80	3,46	2,08	1,77	1,93	1,20
Odch. std. (SD)	1,83	2,06	1,83	2,14	0,41	0,41	0,39	0,49
Błąd std. średniej(SEM)	0,35	0,40	0,35	0,41	0,08	0,08	0,07	0,10
Dolna 95% granica ufności	7,99	6,08	7,08	2,62	1,91	1,61	1,77	1,01
Górna 95% granica ufności	9,44	7,71	8,52	4,31	2,24	1,93	2,08	1,40
Minimum	5	3,2	4,45	0,4	1	0,9	0,95	0,3
Mediana	8,7	7	7,75	2,8	2	1,9	2	1,2
Maximum	12	10,5	11,2	9,5	2,8	2,3	2,55	2,1

Tabela 8. Ciąg dalszy.

C)

	<b>Bax/Bcl-2 NP</b>	<b>Bax/Bcl-2 NK</b>	<b>Bax/Bcl-2 NC</b>	<b>Bax/Bcl-2 LPL</b>
Średnia	49,60	28,30	30,90	0,48
Odch. std. (SD)	34,30	22,80	19,40	0,37
Błąd std. średniej(SEM)	6,48	4,97	4,10	0,08
Dolna 95% granica ufności	36,27	17,90	22,30	0,31
Górna 95% granica ufności	62,89	38,70	39,60	0,65
Minimum	10,8	8,5	12,5	0,03
Mediana	38,6	16	24,4	0,325
Maximum	110	92	74,6	1,35

D)

	<b>TNFR1 NP</b>	<b>TNFR1 NK</b>	<b>TNFR1 NC</b>	<b>TNFR1 LPL</b>	<b>CD 4</b>	<b>CD 8</b>
Średnia	1,89	1,67	1,78	0,89	2,28	2,09
Odch. std. (SD)	0,52	0,44	0,46	0,49	0,57	0,40
Błąd std. średniej(SEM)	0,10	0,08	0,09	0,09	0,11	0,08
Dolna 95% granica ufności	1,69	1,50	1,60	0,70	2,06	1,93
Górna 95% granica ufności	2,09	1,84	1,96	1,08	2,51	2,25
Minimum	0,4	0,4	0,4	0	1,2	1,3
Mediana	2	1,7	1,85	1	2,5	2,2
Maximum	2,9	2,9	2,9	1,8	3	2,7

Tabela 9 A-D. Ekspresja badanych białek w grupie kontrolnej (zdrowa tkanka jelita grubego).

A)

	K3 NP	K3 NK	K3 NC	K3 LPL	Bcl-2 NP	Bcl-2 NK	Bcl-2 NC	Bcl-2 LPL
Średnia	0,80	0,29	0,54	2,98	0,61	0,48	0,55	2,97
Odch. std. (SD)	0,44	0,33	0,31	1,56	0,51	0,30	0,39	0,70
Błąd std. średniej(SEM)	0,14	0,10	0,10	0,49	0,16	0,10	0,12	0,22
Dolna 95% granica ufności	0,48	0,06	0,32	1,87	0,25	0,26	0,27	2,47
Górna 95% granica ufności	1,11	0,52	0,76	4,10	0,97	0,70	0,82	3,47
Minimum	0	0	0	1,6	0,1	0,2	0,2	2,2
Mediana	0,725	0,2	0,475	2,5	0,35	0,3	0,4	2,85
Maximum	1,5	0,9	1,05	6,8	1,5	1,2	1,35	4,6

B)

	Bax NP	Bax NK	Bax NC	Bax LPL	FAS NP	FAS NK	FAS NC	FAS LPL
Średnia	7,76	5,01	6,37	5,63	2,27	2,16	2,22	1,28
Odch. std. (SD)	2,20	2,24	2,07	1,72	0,36	0,25	0,29	0,43
Błąd std. średniej(SEM)	0,70	0,71	0,65	0,54	0,11	0,08	0,09	0,14
Dolna 95% granica ufności	6,19	3,41	4,89	4,40	2,02	1,98	2,01	0,97
Górna 95% granica ufności	9,33	6,61	7,85	6,86	2,53	2,34	2,43	1,59
Minimum	4	2,5	3,3	3	1,6	1,8	1,85	0,6
Mediana	8	4,35	6,1	6,15	2,2	2,15	2,175	1,15
Maximum	10,4	9,5	9,8	8	2,7	2,5	2,6	2

C)

	Bax/Bcl-2 NP przed	Bax/Bcl-2 NK przed	Bax/Bcl-2 NC przed	Bax/Bcl-2 LPL przed
Średnia	23,90	14,60	18,10	1,91
Odch. std. (SD)	18,60	13,20	14,50	0,55
Błąd std. średniej(SEM)	5,90	4,20	4,60	0,17
Dolna 95% granica ufności	10,60	5,20	7,60	1,52
Górna 95% granica ufności	37,20	24,10	28,40	2,31
Minimum	5,3	3,9	4,6	1,19
Mediana	19,1	10	14,1	1,925
Maximum	52	47,5	49	2,69

Tabela 9. Ciąg dalszy.

D)

	TNFR1 NP	TNFR1 NK	TNFR1 NC	TNFR1 LPL	CD 4	CD 8
Średnia	1,18	0,92	1,05	1,29	1,20	1,05
Odch. std. (SD)	0,34	0,29	0,28	0,38	0,35	0,38
Błąd std. średniej(SEM)	0,11	0,09	0,09	0,12	0,11	0,12
Dolna 95% granica ufności	0,94	0,71	0,84	1,02	0,95	0,78
Górna 95% granica ufności	1,42	1,13	1,25	1,56	1,45	1,32
Minimum	0,5	0,6	0,75	0,7	0,7	0,5
Mediana	1,2	0,9	0,975	1,15	1,15	1,05
Maximum	1,7	1,5	1,6	1,8	1,9	1,9

#### 4.3. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej ch.L-C oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych z odpowiedzią na terapię

Aktywność mikroskopowa uległa istotnej redukcji pod wpływem leczenia biologicznego (mediana 5,5 vs 3,6;  $p < 0.04$ ). U 7/21 chorych (33%) uzyskano całkowitą naprawę uszkodzonego uprzednio przez proces chorobowy nabłonka, a u 4/21 (19%) uzyskano normalizację architektoniki tkanek. Zaobserwowano zmniejszenie nacieku zapalnego wyrażające się zmniejszeniem liczebności zarówno LPMC (z całkowitą normalizacją u 3 chorych – 14,2%), jak i granulocytów (z całkowitą normalizacją u 7 pacjentów – 33,3%). Także w odniesieniu do obecności granulocytów obojętnochłonnych w epitelium uzyskano znaczną poprawę – u 11 chorych (52,3%), u których były one uprzednio obecne, stwierdzono brak granulocytów obojętnochłonnych w obrębie nabłonka po leczeniu. W żadnym przypadku po leczeniu nie odnotowano nadżerek/owrzodzeń, podczas gdy przed terapią stwierdzano takie nieprawidłowości w ocenianej podgrupie u 33% badanych. Nie opisano również u żadnym bioptacie po leczeniu ziarniniaka sarkoidalnego (Fot.6,8).

Leczenie anty-TNF- $\alpha$  doprowadziło do istotnego statystycznie spadku ekspresji aktywnej kaspazy 3 w nabłonku jelita grubego – zarówno w części powierzchniowej (3,6 vs 1,8;  $p < 0.02$ ), kryptowej (1,9 vs 0,8;  $p < 0.004$ ), jak i całości nabłonka (2,65 vs

1,4;  $p < 0.02$ ). Z drugiej strony odnotowano istotny wzrost ekspresji tego białka w LPL (0,3 vs 1,9;  $p < 0.03$ ) (Fot.19-21)

W zakresie białek mitochondrialnych z rodziny Bcl-2 nie zaobserwowano istotnej zmiany ekspresji Bcl-2 czy Bax w komórkach nabłonka, podczas gdy w LPL doszło do istotnej redukcji ekspresji Bcl-2 (6,6 vs 3,1;  $p < 0.02$ ), a także wzrostu indeksu Bax/Bcl-2 (0,545 vs 1,42;  $p < 0.03$ ) (Fot.25-26,35).

Ekspresja Fas nie różniła się istotnie zarówno w komórkach nabłonka, jak i LPL przed i po terapii (Fot.41-42). W przypadku białka TNFR1 w LPL ekspresja jego wzrosła, ale wzrost ten był na granicy istotności statystycznej ( $p = 0.0562$ ), natomiast w przypadku komórek nabłonka obserwowano spadek ekspresji TNFR1, który jednak nie osiągnął znamienności statystycznej (Fot.46-47).

Leczenie biologiczne doprowadziło do istotnego zmniejszenia ekspresji CD4 (2,45 vs 1,4;  $p < 0.011$ ) oraz CD8 (2,15 vs 1,6;  $p < 0.025$ ) w LPL (Fot.10,14)

Szczegółowe dane dotyczące zmian ekspresji poszczególnych białek w omawianej grupie przedstawia tabela 10 A-G oraz rycina 12.

Tabela 10 A-G. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej ch.L-C oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych z odpowiedzią na terapię

A)

	AM przed	AM po	K3 NP przed	K3 NP po	K3 NK przed	K3 NK po	K3 NC przed	K3 NC po	K3 LPL przed	K3 LPL po
Średnia	5,40	3,63	3,29	2,12	2,00	0,98	2,64	1,55	0,41	2,03
Odch. std. (SD)	1,69	2,30	1,18	1,53	1,16	0,78	0,96	1,05	0,34	1,27
Błąd std. średniej (SEM)	0,37	0,51	0,30	0,40	0,30	0,20	0,25	0,27	0,09	0,33
Dolna 95% granica ufności	4,63	2,55	2,64	1,27	1,36	0,55	2,11	0,97	0,23	1,33
Górna 95% granica ufności	6,18	4,70	3,95	2,97	2,64	1,41	3,17	2,13	0,60	2,73
Minimum	2	1	0,6	0,2	0,3	0,1	0,45	0,15	0	0,8
Mediana	5,5	3,5	3,6	1,8	1,9	0,8	2,65	1,4	0,3	1,9
Maximum	8,5	8	5,6	5,2	4	3	4,05	4,1	1,2	5,7
	<b><math>p &lt; 0.04</math></b>		<b><math>p &lt; 0.02</math></b>		<b><math>p &lt; 0.004</math></b>		<b><math>p &lt; 0.02</math></b>		<b><math>p &lt; 0.03</math></b>	

Tabela 10. Ciąg dalszy.

B)

	Bcl-2 NP przed	Bcl-2 NP po	Bcl-2 NK przed	Bcl-2 NK po	Bcl-2 NC przed	Bcl-2 NC po	Bcl-2 LPL przed	Bcl-2 LPL po
Średnia	0,16	0,25	0,22	0,43	0,19	0,33	6,44	3,50
Odch. std. (SD)	0,23	0,24	0,29	0,59	0,20	0,36	2,33	2,27
Błąd std. średniej(SEM)	0,06	0,06	0,08	0,15	0,05	0,09	0,62	0,59
Dolna 95% granica ufności	0,02	0,12	0,05	0,10	0,07	0,13	5,09	2,24
Górna 95% granica ufności	0,29	0,39	0,39	0,75	0,30	0,53	7,78	4,76
Minimum	0	0	0	0	0	0	2,9	0,2
Mediana	0,05	0,2	0,1	0,2	0,15	0,2	6,6	3,1
Maximum	0,7	0,9	1	2	0,6	1,45	11,6	7,2
	ns		ns		ns		<b>p&lt;0.02</b>	

C)

	Bax NP przed	Bax NP po	Bax NK przed	Bax NK po	Bax NC przed	Bax NC po	Bax LPL przed	Bax LPL po
Średnia	8,11	9,01	6,92	7,18	7,52	8,11	4,04	5,53
Odch. std. (SD)	1,89	1,88	1,86	2,40	1,84	2,04	2,33	2,95
Błąd std. średniej (SEM)	0,51	0,49	0,50	0,62	0,49	0,53	0,62	0,76
Dolna 95% granica ufności	7,02	7,96	5,85	5,85	6,46	6,98	2,69	3,90
Górna 95% granica ufności	9,21	10,05	8,00	8,51	8,58	9,23	5,38	7,17
Minimum	5	4,8	3,2	3,6	4,45	4,53	1,2	2,1
Mediana	8,4	9,2	7,4	6,6	7,8	8,25	3,85	5
Maximum	11,2	11,2	9,2	10,8	10,2	11	9,5	11,7
	ns		ns		ns		ns	

D)

	Bax/ Bcl-2 NP przed	Bax/ Bcl-2 NP po	Bax/ Bcl-2 NK przed	Bax/ Bcl-2 NK po	Bax/ Bcl-2 NC przed	Bax/ Bcl-2 NC po	Bax/ Bcl-2 LPL przed	Bax/ Bcl-2 LPL po
Średnia	40,60	42,70	37,10	35,30	34,80	36,30	0,62	2,74
Odch. std. (SD)	29,10	30,20	28,60	30,70	20,10	19,40	0,42	3,77
Błąd std. średniej(SEM)	10,90	8,70	9,50	8,50	6,70	5,10	0,13	1,19
Dolna 95% granica ufności	13,70	23,50	15,10	16,70	19,30	25,10	0,32	0,05
Górna 95% granica ufności	67,50	61,90	59,10	53,90	50,30	47,50	0,92	5,44
Minimum	12	12	8,5	3,4	12,5	6,8	0,15	0,29
Mediana	32,5	33,3	34	26,5	32	36,6	0,545	1,42
Maximum	88	112	92	102	68,5	71,3	1,35	13
	ns		ns		ns		<b>p&lt;0.03</b>	

Tabela 10. Ciąg dalszy.

E)

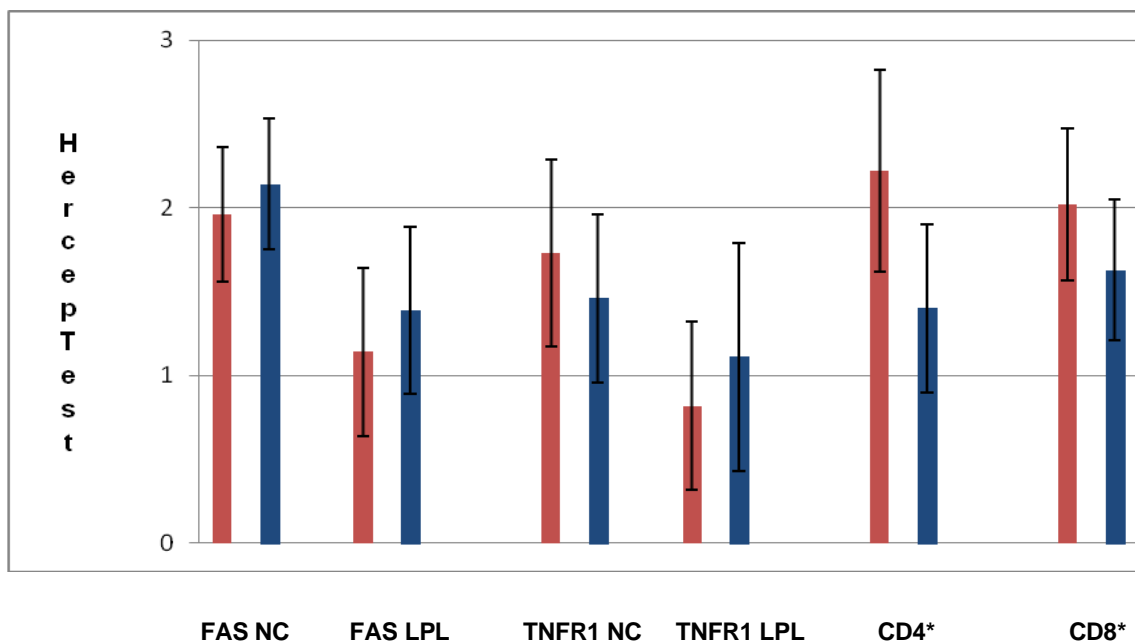
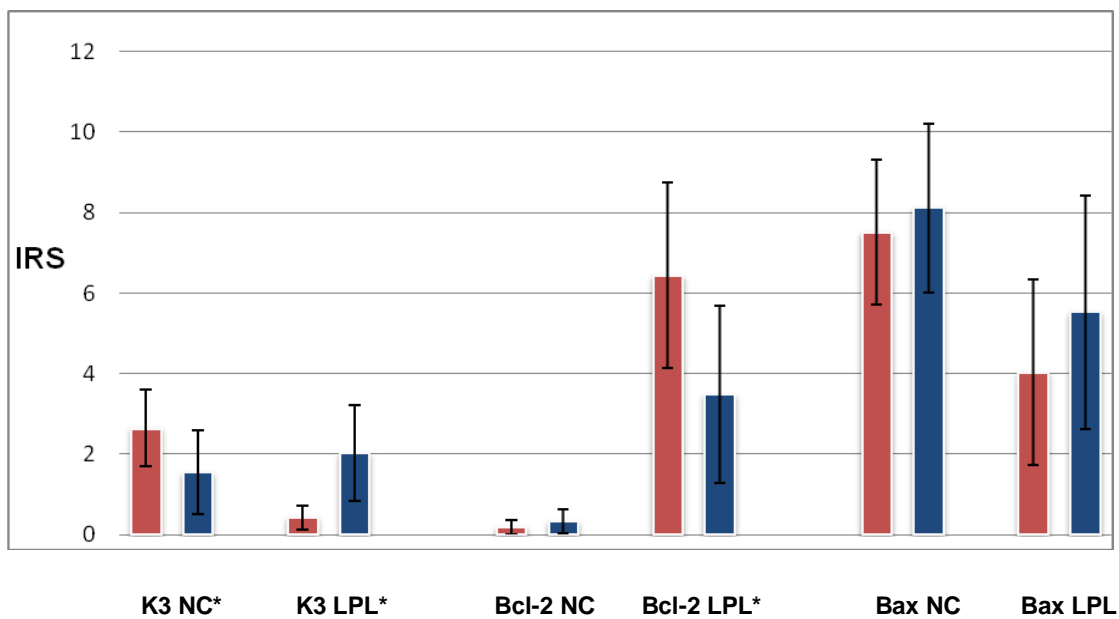
	FAS NP przed	FAS NP po	FAS NK przed	FAS NK po	FAS NC przed	FAS NC po	FAS LPL przed	FAS LPL po
Średnia	2,08	2,33	1,83	1,97	1,96	2,14	1,14	1,39
Odch. std. (SD)	0,44	0,46	0,41	0,39	0,40	0,39	0,53	0,53
Błąd std. średniej(SEM)	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,10	0,15	0,14
Dolna 95% granica ufności	1,83	2,07	1,59	1,75	1,73	1,93	0,82	1,10
Górna 95% granica ufności	2,33	2,58	2,07	2,18	2,19	2,36	1,46	1,69
Minimum	1	1,7	0,9	1,3	0,95	1,6	0,3	0,5
Mediana	2,1	2,2	1,95	2	2	2,15	1,1	1,4
Maximum	2,6	3	2,3	2,5	2,45	2,65	2,1	2,4
	ns		ns		ns		ns	

F)

	TNFR1 NP przed	TNFR1 NP po	TNFR1 NK przed	TNFR1 NK po	TNFR1 NC przed	TNFR1 NC po	TNFR1 LPL przed	TNFR1 LPL po
Średnia	1,80	1,70	1,65	1,21	1,73	1,46	0,82	1,11
Odch. std. (SD)	0,65	0,59	0,57	0,57	0,58	0,56	0,56	0,68
Błąd std. średniej(SEM)	0,17	0,16	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,18
Dolna 95% granica ufności	1,42	1,36	1,32	0,89	1,39	1,14	0,50	0,72
Górna 95% granica ufności	2,18	2,04	1,98	1,54	2,06	1,78	1,15	1,50
Minimum	0,4	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	0	0,1
Mediana	2	1,6	1,7	1,3	1,7	1,45	0,95	1,05
Maximum	2,9	2,7	2,9	2,1	2,9	2,3	1,8	2,3
	ns		ns		ns		p=0.0562	

G)

	CD 4 przed	CD 4 po	CD 8 przed	CD 8 po
Średnia	2,22	1,40	2,02	1,63
Odch. std. (SD)	0,60	0,53	0,45	0,42
Błąd std. średniej(SEM)	0,16	0,14	0,12	0,11
Dolna 95% granica ufności	1,87	1,11	1,76	1,40
Górna 95% granica ufności	2,56	1,69	2,28	1,87
Minimum	1,2	0,6	1,3	1,1
Mediana	2,45	1,4	2,15	1,6
Maximum	3	2,2	2,7	2,4
	p<0.011		p<0.025	



Ryc. 12. Zmiany ekspresji białek pod wpływem leczenia anti-TNF- $\alpha$  w tkankach zmienionych zapalnie u chorych z odpowiedzią na terapię biologiczną. Słupki czerwone – przed leczeniem, słupki niebieskie – po leczeniu anti-TNF- $\alpha$ . \* $p < 0.05$



4.4. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej ch.L-C oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych bez odpowiedzi na terapię.

Aktywność mikroskopowa ch.L-C nie uległa zmianie w przypadku chorych, którzy nie odpowiedzieli na terapię. Jediną komponentą indeksu histologicznego, w której doszło do poprawy, była obecność neutrofilów w nabłonku jelita grubego – stwierdzono zmniejszenie liczebności granulocytów obojętnochłonnych w epitelium z ich całkowitą eliminacją u 4 pacjentów (28,5%). W przypadku pozostałych parametrów nie obserwowano różnic przed i po leczeniu.

Ekspresja aktywnej kaspazy 3 w nabłonku oraz w LPL nie uległa zmianie, aczkolwiek obserwowano jej wzrost w LPL i spadek w epitelium.

Ekspresja białka Bcl-2 w nabłonku wzrosła istotnie w całości nabłonka ( $0,3\pm 0,25$  vs  $0,54\pm 0,41$ ;  $p=0.04$ ), niemniej jednak nadal jej intensywność była słaba. Istotnych zmian w odniesieniu do Bcl-2 nie zaobserwowano natomiast w LPL (Fot.27). Ekspresja Bax malała natomiast istotnie jedynie w przypadku nabłonka powierzchniowego ( $9,23\pm 1,59$  vs  $8,75\pm 1,75$ ;  $p=0.04$ ), jednak nie zmieniła się w nabłonku ocenianym jako całość (Fot.33-34). Podobnie nie zaobserwowano istotnych zmian ekspresji Bax ani indeksu Bax/Bcl-2 w LPL.

W przypadku białka Fas nie odnotowano żadnych istotnych statystycznie zmian w badanych populacjach komórek (Fot.39-40).

Ekspresja TNFR1 natomiast malała znacząco w omawianej grupie zarówno w nabłonku powierzchniowym ( $2,07\pm 0,27$  vs  $1,67\pm 0,67$ ;  $p<0.02$ ), kryptowym ( $1,75\pm 0,22$  vs  $1,29\pm 0,58$ ;  $p<0.05$ ), jak i w całym nabłonku ( $1,91\pm 0,25$  vs  $1,48\pm 0,59$ ;  $p<0.04$ ). Istotnych zmian ekspresji TNFR1 nie odnotowano w LPL (Fot.48-49).

Nie stwierdzono istotnych zmian poziomu ekspresji cząsteczek CD4 i CD8 w LPL w omawianej grupie.

Szczegółowe dane dotyczące zmian ekspresji poszczególnych białek w omawianej grupie przedstawia tabela 11 A-G.

Tabela 11 A-G. Wpływ leczenia biologicznego na zmianę aktywności mikroskopowej ch.L-C oraz na ekspresję badanych białek w tkankach zmienionych zapalnie w grupie chorych bez odpowiedzi na terapię.

A)

	AM przed	AM po	K3 NP przed	K3 NP po	K3 NK przed	K3 NK po	K3 NC przed	K3 NC po	K3 LPL przed	K3 LPL po
Średnia	8,81	8,75	3,71	2,57	2,68	2,40	3,20	2,48	0,43	0,77
Odch. std. (SD)	4,34	3,84	1,80	1,50	1,44	2,07	1,54	1,73	0,52	0,66
Błąd std. średniej(SEM)	1,20	1,11	0,52	0,42	0,41	0,57	0,44	0,48	0,15	0,18
Dolna 95% granica ufności	6,18	6,31	2,57	1,66	1,77	1,15	2,22	1,44	0,09	0,37
Górna 95% granica ufności	11,43	11,19	4,85	3,48	3,60	3,65	4,17	3,52	0,76	1,16
Minimum	1,5	2,5	0,8	0,4	0,1	0	0,45	0,2	0	0
Mediana	11	9,5	3,2	2,1	2,75	1,7	2,975	1,65	0,3	0,75
Maximum	14	15	7	5	5	6,3	5,5	5,35	2	2,5
	ns		ns		ns		ns		ns	

B)

	Bcl-2 NP przed	Bcl-2 NP po	Bcl-2 NK przed	Bcl-2 NK po	Bcl-2 NC przed	Bcl-2 NC po	Bcl-2 LPL przed	Bcl-2 LPL po
Średnia	0,34	0,50	0,27	0,58	0,30	0,54	7,64	6,93
Odch. std. (SD)	0,29	0,34	0,24	0,57	0,25	0,41	2,08	3,20
Błąd std. średniej(SEM)	0,08	0,09	0,07	0,16	0,07	0,11	0,60	0,89
Dolna 95% granica ufności	0,16	0,30	0,11	0,23	0,15	0,30	6,32	5,00
Górna 95% granica ufności	0,52	0,70	0,42	0,92	0,46	0,79	8,96	8,86
Minimum	0	0	0	0	0	0	3,8	0,4
Mediana	0,3	0,5	0,25	0,5	0,225	0,5	7,7	7,5
Maximum	1,1	1	0,8	2	0,95	1,4	10,5	10,9
	ns		p=0.0689		<b>p=0.04</b>		ns	

Tabela 11. Ciąg dalszy.

C)

	Bax NP przed	Bax NP po	Bax NK przed	Bax NK po	Bax NC przed	Bax NC po	Bax LPL przed	Bax LPL po
Średnia	9,23	8,75	6,63	7,66	7,92	8,20	2,78	3,22
Odch. std. (SD)	1,59	1,75	2,28	2,08	1,81	1,69	1,88	1,84
Błąd std. średniej(SEM)	0,46	0,51	0,66	0,60	0,52	0,49	0,54	0,53
Dolna 95% granica ufności	8,22	7,64	5,18	6,34	6,77	7,13	1,58	2,05
Górna 95% granica ufności	10,25	9,87	8,07	8,98	9,07	9,28	3,97	4,38
Minimum	6	6	3,8	3,8	5,1	5,5	0,4	0,7
Mediana	8,95	8,95	6,25	7,9	7,725	7,85	2,4	3,05
Maximum	12	11,7	10,5	10,2	11,2	10,6	7	7,2
	<b>p=0.04</b>		ns		ns		ns	

D)

	Bax/Bcl-2 NP przed	Bax/Bcl-2 NP po	Bax/Bcl-2 NK przed	Bax/Bcl-2 NK po	Bax/Bcl-2 NC przed	Bax/Bcl-2 NC po	Bax/Bcl-2 LPL przed	Bax/Bcl-2 LPL po
Średnia	37,10	26,70	20,50	17,60	31,40	25,90	0,37	0,72
Odch. std. (SD)	26,10	23,70	13,60	16,50	18,70	24,40	0,27	0,61
Błąd std. średniej(SEM)	7,80	6,80	4,50	5,20	5,60	7,10	0,08	0,18
Dolna 95% granica ufności	19,50	11,60	9,90	5,80	18,80	10,30	0,19	0,31
Górna 95% granica ufności	54,60	41,80	30,90	29,40	44,00	41,40	0,55	1,13
Minimum	9,9	6	10	4,7	9,9	6,1	0,03	0,12
Mediana	30	17,3	15,6	9,7	28,4	14,5	0,27	0,53
Maximum	87	88	55	51	74,6	79	0,94	1,75
	ns		ns		ns		ns	

E)

	FAS NP przed	FAS NP po	FAS NK przed	FAS NK po	FAS NC przed	FAS NC po	FAS LPL przed	FAS LPL po
Średnia	1,98	1,82	1,63	1,66	1,80	1,75	1,32	1,31
Odch. std. (SD)	0,35	0,40	0,37	0,32	0,34	0,34	0,37	0,57
Błąd std. średniej(SEM)	0,10	0,11	0,11	0,09	0,10	0,09	0,11	0,16
Dolna 95% granica ufności	1,76	1,58	1,39	1,47	1,59	1,54	1,07	0,96
Górna 95% granica ufności	2,20	2,06	1,86	1,86	2,01	1,95	1,57	1,65
Minimum	1,5	1	1,2	1,1	1,35	1,1	0,3	0,4
Mediana	2	2	1,6	1,6	1,725	1,85	1,4	1,2
Maximum	2,7	2,4	2,3	2,1	2,35	2,15	1,7	2,2
	ns		ns		ns		ns	

Tabela 11. Ciąg dalszy.

F)

	TNFR1 NP przed	TNFR1 NP po	TNFR1 NK przed	TNFR1 NK po	TNFR1 NC przed	TNFR1 NC po	TNFR1 LPL przed	TNFR1 LPL po
Średnia	2,07	1,67	1,75	1,29	1,91	1,48	0,98	0,97
Odch. std. (SD)	0,27	0,67	0,22	0,58	0,25	0,59	0,44	0,44
Błąd std. średniej(SEM)	0,08	0,19	0,06	0,16	0,07	0,16	0,13	0,12
Dolna 95% granica ufności	1,90	1,26	1,61	0,94	1,75	1,13	0,70	0,70
Górną 95% granica ufności	2,24	2,07	1,89	1,64	2,07	1,84	1,25	1,23
Minimum	1,6	0,6	1,4	0,3	1,5	0,45	0,4	0,3
Mediana	2,05	1,8	1,7	1,4	1,875	1,4	1,1	0,9
Maximum	2,6	2,8	2,2	2,2	2,45	2,45	1,6	1,6
	<b>p&lt;0.02</b>		<b>p&lt;0.05</b>		<b>p&lt;0.04</b>		ns	

G)

	CD 4 przed	CD 4 po	CD 8 przed	CD 8 po
Średnia	2,40	2,11	2,19	2,02
Odch. std. (SD)	0,61	0,69	0,29	0,73
Błąd std. średniej(SEM)	0,18	0,19	0,08	0,20
Dolna 95% granica ufności	2,01	1,69	2,01	1,57
Górną 95% granica ufności	2,79	2,53	2,37	2,46
Minimum	1,2	0,7	1,7	0,7
Mediana	2,5	2,4	2,2	2,2
Maximum	3	2,9	2,7	2,9
	ns		ns	

4.5. Porównanie aktywności mikroskopowej oraz ekspresji białek w tkankach zmienionych zapalnie przed leczeniem w grupie z odpowiedzią oraz w grupie bez odpowiedzi na terapię biologiczną.

Jedynie w zakresie aktywności mikroskopowej ch.L-C istniały różnice przed leczeniem pomiędzy grupą, która ostatecznie odpowiedziała i tą, która nie zareagowała na terapię anty-TNF- $\alpha$ . Spośród elementów wchodzących w skład indeksu histologicznej aktywności choroby dysproporcja pomiędzy obiema grupami dotyczyła każdego z nich, a ostateczna różnica wynosiła  $5,4 \pm 1,69$  w grupie z odpowiedzią vs  $8,81 \pm 4,34$  wśród chorych bez odpowiedzi na terapię ( $p < 0.02$ ). Nie

stwierdzono natomiast istotnych różnic w zakresie ekspresji badanych białek w obu grupach przed leczeniem.

#### 4.6. Wpływ leczenia biologicznego na ekspresję badanych białek przed i po terapii w tkankach niezmiennych zapalnie

Leczenie anty-TNF- $\alpha$  doprowadziło do istotnego zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD4 w LPL w tkankach niezmiennych zapalnie, w przypadku pozostałych białek pozostawało bez znamiennego wpływu (Tabela 12 A-G) (Fot.11-12,15-16,22,28-29,36,43,50).

Tabela 12 A-G. Wpływ leczenia biologicznego na ekspresję badanych białek przed i po terapii w tkankach niezmiennych zapalnie.

A)

	K3 NP przed	K3 NP po	K3 NK przed	K3 NK po	K3 NC przed	K3 NC po	K3 LPL przed	K3 LPL po
Średnia	2,46	1,30	1,00	0,55	1,73	0,91	0,81	0,63
Odch. std. (SD)	1,59	1,16	0,61	0,55	0,92	0,80	0,74	0,35
Błąd std. średniej(SEM)	0,46	0,32	0,18	0,15	0,27	0,22	0,21	0,10
Dolna 95% granica ufności	1,45	0,60	0,62	0,22	1,15	0,43	0,34	0,40
Górna 95% granica ufności	3,47	2,00	1,39	0,89	2,32	1,39	1,28	0,85
Minimum	0,8	0	0,3	0	0,56	0,1	0,1	0,3
Mediana	1,9	0,9	0,9	0,4	1,375	0,64	0,55	0,6
Maximum	6	4,6	2	1,8	3,4	2,9	2,3	1,4
	ns		ns		ns		ns	

B)

	Bcl-2 NP przed	Bcl-2 NP po	Bcl-2 NK przed	Bcl-2 NK po	Bcl-2 NC przed	Bcl-2 NC po	Bcl-2 LPL przed	Bcl-2 LPL po
Średnia	0,55	0,19	0,20	0,32	0,38	0,25	4,45	3,28
Odch. std. (SD)	0,77	0,36	0,42	0,30	0,53	0,26	3,12	2,48
Błąd std. średniej(SEM)	0,22	0,10	0,12	0,08	0,15	0,07	0,90	0,69
Dolna 95% granica ufności	0,06	-0,02	-0,07	0,14	0,04	0,10	2,47	1,78
Górna 95% granica ufności	1,04	0,41	0,47	0,51	0,71	0,41	6,44	4,78
Minimum	0	0	0	0	0	0	1,3	0,2
Mediana	0,15	0	0,05	0,3	0,175	0,15	3,75	2,1
Maximum	2,1	1,3	1,5	0,9	1,75	0,9	11,3	7,4
	ns		ns		ns		ns	

Tabela 12. Ciąg dalszy.

C)

	Bax NP przed	Bax NP po	Bax NK przed	Bax NK po	Bax NC przed	Bax NC po	Bax LPL przed	Bax LPL po
Średnia	8,08	8,31	7,14	5,95	7,50	7,13	3,94	5,63
Odch. std. (SD)	3,24	2,67	2,71	2,03	3,00	2,17	1,59	2,70
Błąd std. średniej(SEM)	0,94	0,74	0,78	0,56	0,86	0,60	0,46	0,75
Dolna 95% granica ufności	6,02	6,69	5,42	4,72	5,60	5,82	2,93	4,00
Górna 95% granica ufności	10,14	9,92	8,86	7,17	9,41	8,44	4,95	7,26
Minimum	1,6	3	2	3	1,8	3	0,8	1
Mediana	8	8	7,4	5,4	7,675	7	3,8	5
Maximum	12	12	10,8	10,5	11,4	11,25	7,4	10,2
	ns		ns		ns		p=0.0617	

D)

	Bax/Bcl-2 NP przed	Bax/Bcl-2 NP po	Bax/Bcl-2 NK przed	Bax/Bcl-2 NK po	Bax/Bcl-2 NC przed	Bax/Bcl-2 NC po	Bax/Bcl-2 LPL przed	Bax/Bcl-2 LPL po
Średnia	26,60	38,60	25,90	20,60	28,30	40,80	1,29	6,27
Odch. std. (SD)	33,30	25,20	11,20	14,80	22,70	35,40	0,81	8,99
Błąd std. średniej(SEM)	11,70	10,30	4,60	4,70	7,60	10,70	0,26	2,84
Dolna 95% granica ufności	-1,20	12,10	14,10	9,90	10,80	17,10	0,71	-0,16
Górna 95% granica ufności	54,40	65,10	37,80	31,20	45,70	64,70	1,87	12,70
Minimum	2,2	8,3	7,2	5	4,5	10	0,36	0,66
Mediana	14,2	31	28,3	15	27,7	28,3	1,05	1,925
Maximum	102	80	40	50	66,6	128	2,9	28
	ns		ns		ns		ns	

E)

	FAS NP przed	FAS NP po	FAS NK przed	FAS NK po	FAS NC przed	FAS NC po	FAS LPL przed	FAS LPL po
Średnia	2,45	2,14	1,98	1,70	2,24	1,91	1,43	0,82
Odch. std. (SD)	0,36	0,47	0,44	0,70	0,37	0,53	0,53	0,56
Błąd std. średniej(SEM)	0,11	0,13	0,13	0,19	0,12	0,15	0,16	0,16
Dolna 95% granica ufności	2,19	1,86	1,69	1,28	1,97	1,59	1,08	0,48
Górna 95% granica ufności	2,71	2,42	2,28	2,12	2,50	2,23	1,78	1,16
Minimum	1,7	1,5	0,9	0,2	1,3	0,85	0,3	0,2
Mediana	2,55	2	2	1,8	2,35	2	1,7	0,7
Maximum	2,8	3	2,5	2,9	2,55	2,85	1,9	1,8
	ns		ns		p=0.07		ns	

Tabela 12. Ciąg dalszy.

F)

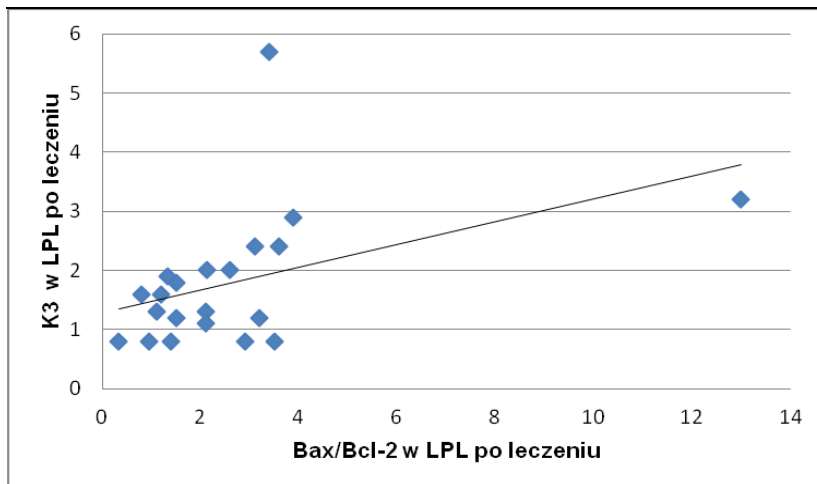
	TNFR1 NP przed	TNFR1 NP po	TNFR1 NK przed	TNFR1 NK po	TNFR1 NC przed	TNFR1 NC po	TNFR1 LPL przed	TNFR1 LPL po
Średnia	1,74	1,76	1,39	1,26	1,54	1,51	1,14	1,08
Odch. std. (SD)	0,50	0,61	0,39	0,61	0,41	0,57	0,45	0,75
Błąd std. średniej(SEM)	0,15	0,17	0,11	0,17	0,12	0,16	0,13	0,21
Dolna 95% granica ufności	1,40	1,39	1,14	0,89	1,26	1,17	0,86	0,63
Górna 95% granica ufności	2,07	2,13	1,64	1,63	1,81	1,86	1,43	1,53
Minimum	1,2	0,4	0,7	0,3	0,95	0,35	0,5	0,2
Mediana	1,6	1,9	1,4	1,3	1,55	1,5	1,1	0,9
Maximum	2,6	2,6	1,9	2	2,15	2,25	2	2,6
	ns		ns		ns		ns	

G)

	CD 4 przed	CD 4 po	CD 8 przed	CD 8 po
Średnia	1,99	1,06	1,83	1,30
Odch. std. (SD)	0,55	0,73	0,63	0,67
Błąd std. średniej(SEM)	0,16	0,20	0,18	0,19
Dolna 95% granica ufności	1,64	0,62	1,44	0,89
Górna 95% granica ufności	2,34	1,50	2,23	1,71
Minimum	0,9	0,2	1	0,2
Mediana	2,2	1	2,05	1,4
Maximum	2,7	2,7	2,5	2,3
	<b>p&lt;0.05</b>		ns	

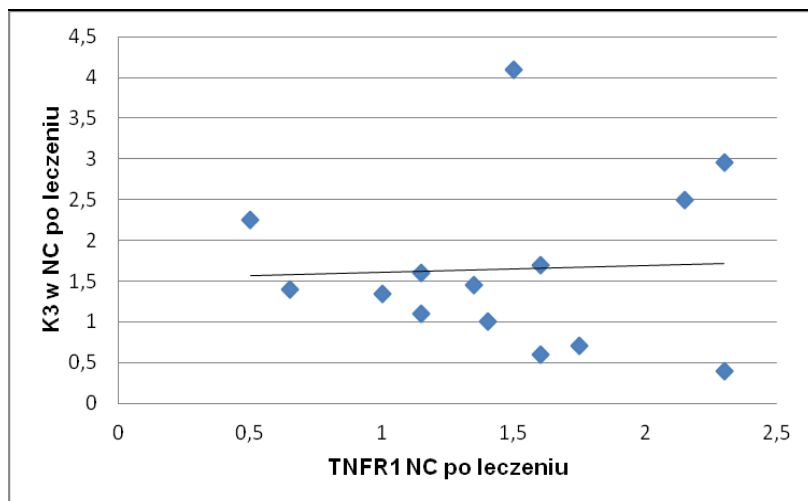
#### 4.7. Wybrane korelacje pomiędzy markerami immunocytochemicznymi (Ryc.13)

A)



$p < 0.05$ ;  $r = 0.4224$

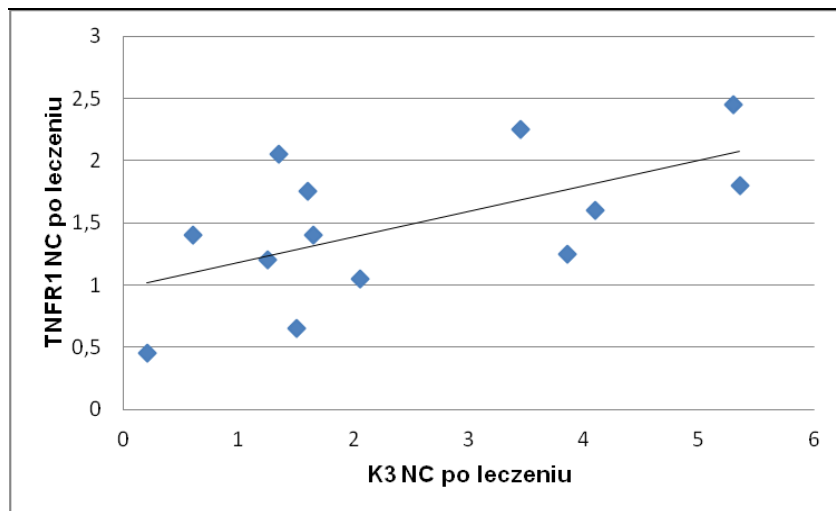
B)



$p < 0.005$ ;  $r = 0.5772$



C)



$p < 0.03$ ;  $r = 0.6014$

Ryc. 13 Koreacje pomiędzy wybranymi parametrami immunocytochemicznymi:

- A) kaspaza 3 a Bax/Bcl-2 w LPL w grupie, która odpowiedziała na leczenie – po terapii
- B) kaspaza 3 a TNFR1 w nabłonku w grupie, która odpowiedziała na leczenie – po terapii
- C) kaspaza 3 a TNFR1 w nabłonku w grupie, która nie odpowiedziała na leczenie – po terapii.

4.8. Wpływ leczenia biologicznego na ekspresję badanych białek oceniane w grupie chorych leczonych IFX i ADA.

Tabela 13. Charakterystyka grupy leczonej IFX i ADA.

Cecha	Leczeni infliksymabem (n=21)	Leczeni adalimumabem (n=14)	Różnica statystyczna między IFX a ADA
<b><u>Płeć</u></b>			
Mężczyźni/Kobiety (procentowy udział kobiet)	9/12 (57%)	4/10 (71%)	---
<b><u>Wiek (lata)</u></b>			
Średnia ± SD	30±10	33±13	ns
<b><u>Czas trwania objawów chorobowych (lata)</u></b>			
Średnia ± SD	8±4	9±5	ns
<b><u>Czas, jaki minął od momentu postawienia diagnozy ch.L-C (lata)</u></b>			
Średnia ± SD	5±4	7±5	ns
<b><u>Lokalizacja zmian chorobowych</u></b>			
1. jelito grube	21/21 (100%)	14/14 (100%)	----
2. jelito cienkie	16/21 (76%)	9/14 (64%)	
3. żołądkowo-dwunastnicza	0/21 (0%)	1/14 (7%)	
4. przetoki okołodobytowe	6/21 (28%)	4/14 (28%)	
5. inne przetoki	2/21 (9%)	2/14 (14%)	
<b><u>Typ choroby</u></b>			
1. zapalny	11/21 (52%)	9/14 (64%)	---
2. zapalny + penetrujący	10/21 (48%)	5/14 (36%)	
3. inny	0 (0%)	0 (0%)	
<b><u>Wyjściowe CDAI (pkt.)</u></b>			
Mediana (95% CI) [min – max]	226 (210-301) [107-488]	274 (205-309) [109-406]	ns
<b><u>Wyjściowe CRP (mg/l)</u></b>			
Średnia ± SD	20,3±19,1	22,9±26,1	ns
<b><u>Wyjściowe SES-CD (pkt.)</u></b>			
Mediana (95% CI) [min – max]	11 (9-17) [2-33]	11 (7-17) [1-30]	ns

<b>Przyjmowane leki</b>			
1. aminosalicylany	21/21 (100%)	14/14 (100%)	
2. steroidy	8/21 (38%)	6/14 (43%)	
3. azatiopryna	18/21 (86%)	(76%)	---
4. antybiotyki	4/21 (19%)	(50%)	
5. probiotyki	20/21 (95%)	14/14 (100%)	

Poza istotnie wyższym wyjściowym stężeniem fibrynogenu w grupie leczonej ADA (528,6±132 mg/dl vs 443±95 mg/dl; p<0.04) nie odnotowano znamiennych różnic zarówno w zakresie pozostałych parametrów biochemicznych, jak i w zakresie ekspresji badanych białek czy aktywności mikroskopowej ch.L-C przed leczeniem. Wpływ IFX oraz ADA na ekspresję badanych białek prezentują tabele 14 i 15.

Tabela 14 A-G. Wpływ IFX na ekspresję badanych białek.

A)

	AM przed	AM po	K3 NP przed	K3 NP po	K3 NK przed	K3 NK po	K3 NC przed	K3 NC po	K3 LPL przed	K3 LPL po
Średnia	6,48	5,25	3,28	2,53	2,20	1,69	2,73	2,11	0,49	1,63
odch. std. (SD)	3,44	3,47	1,41	1,47	1,33	1,54	1,27	1,33	0,48	1,42
Błąd std. średniej(SEM)	0,77	0,78	0,37	0,37	0,34	0,38	0,33	0,33	0,12	0,36
Dolna 95% granica ufności	4,86	3,62	2,50	1,74	1,47	0,88	2,03	1,40	0,22	0,87
górna 95% granica ufności	8,09	6,88	4,06	3,31	2,93	2,51	3,44	2,82	0,75	2,38
Minimum	1,5	1	0,6	0,2	0,3	0,1	0,45	0,15	0	0
Mediana	6,25	5	2,9	2,25	1,9	1,2	2,5	1,675	0,3	1,4
Maximum	13	12	6,3	5	5	6,3	5,15	5,35	2	5,7
	<b>&lt;0.0001</b>		<b>p&lt;0.05</b>		ns		<b>p&lt;0.03</b>		<b>p&lt;0.04</b>	

B)

	Bcl-2 NP przed	Bcl-2 NP po	Bcl-2 NK przed	Bcl-2 NK po	Bcl-2 NC przed	Bcl-2 NC po	Bcl-2 LPL przed	Bcl-2 LPL po
Średnia	0,25	0,46	0,30	0,53	0,27	0,48	6,42	5,48
Odch. std. (SD)	0,30	0,36	0,30	0,65	0,24	0,46	2,09	3,07
Błąd std. średniej(SEM)	0,08	0,09	0,08	0,16	0,06	0,12	0,54	0,77
Dolna 95% granica ufności	0,08	0,27	0,14	0,18	0,14	0,24	5,27	3,84
Górna 95% granica ufności	0,41	0,65	0,46	0,87	0,41	0,73	7,58	7,11
Minimum	0	0	0	0	0	0	2,9	0,4
Mediana	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,275	7,2	5,05
Maximum	1,1	1	1	2	0,95	1,45	9,8	10,9
	ns		ns		ns		ns	

Tabela 14. Ciąg dalszy.

C)

	Bax NP przed	Bax NP po	Bax NK przed	Bax NK po	Bax NC przed	Bax NC po	Bax LPL przed	Bax LPL po
Średnia	8,63	9,18	6,99	8,28	7,81	8,73	3,51	5,42
Odch. std. (SD)	1,82	2,12	1,79	2,04	1,69	1,93	1,50	3,03
Błąd std. średniej(SEM)	0,47	0,55	0,46	0,53	0,44	0,50	0,39	0,78
Dolna 95% granica ufności	7,62	8,00	6,00	7,15	6,87	7,66	2,68	3,75
Górna 95% granica ufności	9,64	10,36	7,98	9,41	8,74	9,80	4,34	7,10
Minimum	5,5	4,8	4,2	5	5,1	5,15	1,3	1,4
Mediana	8,5	10,2	7,5	9,1	8	9,35	3,5	4,6
Maximum	12	11,7	10,5	10,8	11,2	11	7	11,7
	ns		p=0.0550		ns		ns	

D)

	Bax/Bcl-2 NP przed	Bax/Bcl-2 NP po	Bax/Bcl-2 NK przed	Bax/Bcl-2 NK po	Bax/Bcl-2 NC przed	Bax/Bcl-2 NC po	Bax/Bcl-2 LPL przed	Bax/Bcl-2 LPL po
Średnia	40,70	31,70	28,20	30,90	34,10	29,60	0,59	2,22
Odch. std. (SD)	27,70	28,30	20,30	27,50	20,90	21,40	0,36	3,67
Błąd std. średniej(SEM)	8,30	7,60	5,80	7,60	5,80	5,70	0,11	1,11
Dolna 95% granica ufności	22,10	15,20	15,30	14,30	21,30	17,20	0,35	-0,24
Górna 95% granica ufności	59,30	48,00	41,20	47,60	46,60	42,00	0,83	4,69
Minimum	9,9	6	8,5	4,6	9,9	6,1	0,16	0,12
Mediana	32,5	22,9	15,8	21,6	32	26,9	0,52	1,1
Maximum	88	112	64	102	74,6	71,3	1,35	13
	ns		ns		ns		p<0.02	

E)

	FAS NP przed	FAS NP po	FAS NK przed	FAS NK po	FAS NC przed	FAS NC po	FAS LPL przed	FAS LPL po
Średnia	2,04	2,01	1,81	1,81	1,93	1,91	1,15	1,38
Odch. std. (SD)	0,46	0,52	0,42	0,36	0,42	0,43	0,41	0,57
Błąd std. średniej(SEM)	0,12	0,13	0,11	0,09	0,11	0,11	0,11	0,14
Dolna 95% granica ufności	1,79	1,73	1,58	1,61	1,70	1,68	0,92	1,08
Górna 95% granica ufności	2,29	2,29	2,04	2,00	2,16	2,14	1,37	1,69
Minimum	1	1	0,9	1,2	0,95	1,1	0,3	0,5
Mediana	2	1,95	2	1,8	2	1,9	1,2	1,4
Maximum	2,6	3	2,3	2,4	2,45	2,65	1,7	2,4
	ns		ns		ns		ns	

Tabela 14. Ciąg dalszy.

F)

	TNFR1 NP przed	TNFR1 NP po	TNFR1 NK przed	TNFR1 NK po	TNFR1 NC przed	TNFR1 NC po	TNFR1 LPL przed	TNFR1 LPL po
Średnia	1,88	1,71	1,67	1,27	1,78	1,49	0,97	1,19
Odch. std. (SD)	0,56	0,72	0,44	0,59	0,49	0,62	0,50	0,64
Błąd std. średniej(SEM)	0,15	0,18	0,11	0,15	0,13	0,16	0,13	0,17
Dolna 95% granica ufności	1,57	1,31	1,43	0,94	1,51	1,15	0,69	0,83
Górna 95% granica ufności	2,20	2,10	1,91	1,59	2,05	1,83	1,25	1,54
Minimum	0,4	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	0,2	0,1
Mediana	2	1,7	1,7	1,4	1,85	1,6	1	1,4
Maximum	2,6	2,8	2,2	2,1	2,45	2,3	1,8	2,3
	ns		p<0.03		p<0.04		ns	

G)

	CD 4 przed	CD 4 po	CD 8 przed	CD 8 po
Średnia	2,33	1,79	2,11	1,89
Odch. std. (SD)	0,63	0,68	0,42	0,63
Błąd std. średniej(SEM)	0,16	0,17	0,11	0,16
Dolna 95% granica ufności	1,98	1,43	1,88	1,56
Górna 95% granica ufności	2,68	2,16	2,35	2,23
Minimum	1,2	0,7	1,3	1
Mediana	2,5	1,85	2,2	1,85
Maximum	3	2,9	2,7	2,9
	p<0.03		ns	

Tabela 15 A-G. Wpływ ADA na ekspresję badanych białek.

A)

	AM przed	AM po	K3 NP przed	K3 NP po	K3 NK przed	K3 NK po	K3 NC przed	K3 NC po	K3 LPL przed	K3 LPL po
Średnia	7,15	6,45	3,73	2,06	2,43	1,57	3,08	1,81	0,33	1,20
odch. std. (SD)	3,49	4,51	1,56	1,58	1,34	1,87	1,26	1,65	0,33	0,81
Błąd std. średniej(SEM)	0,97	1,36	0,45	0,45	0,39	0,54	0,36	0,48	0,10	0,23
dolna 95% granica ufności	5,04	3,43	2,73	1,06	1,59	0,38	2,28	0,77	0,12	0,68
górną 95% granica ufności	9,26	9,48	4,72	3,07	3,28	2,75	3,88	2,86	0,55	1,71
Minimum	2	1	0,8	0,4	0,1	0	0,45	0,2	0	0,3
Mediana	6	5	3,5	1,785	2,6	0,7	3	1,3	0,2	0,85
Maximum	14	15	7	5,2	4	5,8	5,5	5,3	1,2	2,9
	ns		<b>p&lt;0.04</b>		ns		p=0.0674		<b>p&lt;0.002</b>	

B)

	Bcl-2 NP przed	Bcl-2 NP po	Bcl-2 NK przed	Bcl-2 NK po	Bcl-2 NC przed	Bcl-2 NC po	Bcl-2 LPL przed	Bcl-2 LPL po
Średnia	0,24	0,25	0,16	0,46	0,20	0,36	7,77	4,58
Odch. std. (SD)	0,24	0,19	0,20	0,49	0,21	0,27	2,34	3,44
Błąd std. średniej(SEM)	0,07	0,05	0,06	0,14	0,06	0,08	0,71	0,99
Dolna 95% granica ufności	0,07	0,13	0,03	0,15	0,06	0,19	6,20	2,40
Górna 95% granica ufności	0,40	0,37	0,30	0,77	0,34	0,53	9,35	6,77
Minimum	0	0	0	0	0	0,1	3,8	0,2
Mediana	0,2	0,25	0,1	0,35	0,2	0,25	7,6	4,7
Maximum	0,7	0,6	0,5	1,6	0,6	0,85	11,6	10,1
	<b>p&lt;0.03</b>		ns		<b>p&lt;0.002</b>		<b>p&lt;0.01</b>	

C)

	Bax/Bcl-2 NP przed	Bax/Bcl-2 NP po	Bax/Bcl-2 NK przed	Bax/Bcl-2 NK po	Bax/Bcl-2 NC przed	Bax/Bcl-2 NC po	Bax/Bcl-2 LPL przed	Bax/Bcl-2 LPL po
Średnia	34,90	39,00	29,90	23,30	31,10	33,70	0,37	1,09
Odch. std. (SD)	26,10	27,90	30,70	26,10	15,80	23,50	0,35	1,16
Błąd std. średniej(SEM)	9,80	8,80	12,50	8,20	6,00	6,80	0,11	0,37
Dolna 95% granica ufności	10,80	19,00	-2,20	4,60	16,40	18,70	0,12	0,27
Górna 95% granica ufności	59,00	59,00	62,00	41,90	45,70	48,60	0,63	1,92
Minimum	12	15,1	13,2	3,4	12,5	8,1	0,03	0,21
Mediana	23	29,3	17,3	15,2	28,4	29,1	0,275	0,65
Maximum	87	92	92	92	51	79	1,3	3,88
	ns		ns		ns		<b>p&lt;0.004</b>	

Tabela 15. Ciąg dalszy.

D)

	Bax NP przed	Bax NP po	Bax NK przed	Bax NK po	Bax NC przed	Bax NC po	Bax LPL przed	Bax LPL po
Średnia	8,64	8,53	6,50	6,28	7,57	7,42	3,38	3,36
Odch. std. (SD)	1,90	1,28	2,37	2,02	2,02	1,54	2,96	1,86
Błąd std. średniej(SEM)	0,57	0,37	0,72	0,58	0,61	0,44	0,89	0,54
Dolna 95% granica ufności	7,36	7,72	4,91	5,00	6,21	6,44	1,39	2,18
Górna 95% granica ufności	9,92	9,35	8,09	7,57	8,92	8,40	5,37	4,54
Minimum	5	6,6	3,2	3,6	4,45	4,53	0,4	0,7
Mediana	8,7	8,5	6,6	6,2	7,5	7,125	2,3	3
Maximum	11,2	10,8	10	9,7	10,5	9,8	9,5	7
	ns		ns		ns		ns	

E)

	FAS NP przed	FAS NP po	FAS NK przed	FAS NK po	FAS NC przed	FAS NC po	FAS LPL przed	FAS LPL po
Średnia	2,02	2,21	1,63	1,85	1,83	2,03	1,34	1,32
Odch. std. (SD)	0,31	0,44	0,37	0,43	0,31	0,40	0,54	0,52
Błąd std. średniej(SEM)	0,09	0,13	0,11	0,12	0,09	0,11	0,18	0,15
Dolna 95% granica ufności	1,81	1,93	1,38	1,58	1,62	1,77	0,93	0,98
Górna 95% granica ufności	2,23	2,49	1,87	2,12	2,04	2,28	1,76	1,65
Minimum	1,6	1,3	1,1	1,1	1,45	1,2	0,3	0,4
Mediana	2	2,1	1,8	1,95	2	2	1,2	1,3
Maximum	2,7	2,9	2	2,5	2,35	2,65	2,1	2,1
	ns		ns		ns		ns	

F)

	TNFR1 NP przed	TNFR1 NP po	TNFR1 NK przed	TNFR1 NK po	TNFR1 NC przed	TNFR1 NC po	TNFR1 LPL przed	TNFR1 LPL po
Średnia	1,98	1,66	1,73	1,23	1,85	1,45	0,79	0,86
Odch. std. (SD)	0,48	0,49	0,47	0,56	0,44	0,50	0,51	0,42
Błąd std. średniej(SEM)	0,14	0,14	0,14	0,16	0,13	0,15	0,16	0,12
Dolna 95% granica ufności	1,66	1,34	1,41	0,88	1,56	1,13	0,45	0,59
Górna 95% granica ufności	2,30	1,97	2,04	1,59	2,15	1,77	1,14	1,13
Minimum	1,1	0,6	1,2	0,3	1,35	0,45	0	0,3
Mediana	2	1,6	1,6	1,25	1,8	1,4	0,9	0,9
Maximum	2,9	2,6	2,9	2,2	2,9	2,45	1,5	1,5
	ns		ns		ns		ns	

Tabela 15. Ciąg dalszy.

G)

	CD 4 przed	CD 4 po	CD 8 przed	CD 8 po
Średnia	2,19	1,64	2,09	1,70
Odch. std. (SD)	0,55	0,74	0,38	0,59
Błąd std. średniej(SEM)	0,17	0,21	0,12	0,17
Dolna 95% granica ufności	1,80	1,17	1,82	1,33
Górną 95% granica ufności	2,59	2,11	2,36	2,07
Minimum	1,2	0,6	1,5	0,7
Mediana	2,45	1,75	2,15	1,6
Maximum	2,9	2,8	2,7	2,8
	ns		ns	



## 5. Dyskusja

W niniejszej pracy wpływ leczenia antycytokinowego na ekspresję wybranych białek zaangażowanych w proces apoptozy rozpatrywano w co najmniej dwojakim aspekcie. Z jednej strony skupiono się na ocenie związku leczenia biologicznego z modulacją programowanej śmierci komórkowej w kontekście skuteczności tej formy terapii. Aby podjąć próbę odpowiedzi na to pytanie, rozpatrywano chorych z ch.L-C jako całość, niezależnie od zastosowanego leku – zasadniczym kryterium było stwierdzenie lub nie odpowiedzi na wdrożoną terapię. Przesłanką do dokonania takiego podziału jest teza oparta na dotychczas zgromadzonych danych, że mechanizmy działania obu leków są identyczne [113]. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w algorytmach postępowania dotyczących wyboru leku (IFX vs ADA) w momencie kwalifikacji chorego do leczenia biologicznego. Wytyczne ECCO mówią, że oba leki są równie skuteczne i decyzja o zastosowaniu IFX lub ADA zależy w dużej mierze od doświadczenia ośrodka leczącego i od preferencji pacjenta. Wyjątkiem jest obecność przetok okołoodbytowych – w tej sytuacji lekiem preferowanym jest IFX [64]. Wydaje się bowiem, że odsetek odpowiedzi na terapię (definiowanych jako zamknięcie przetoki/przetok) w obserwacji krótkotrwałej jest nieco większy w przypadku IFX. Z drugiej jednak strony, analizując odległe wyniki badań klinicznych można zaobserwować, że z upływem czasu efektywność IFX w podtrzymywaniu postaci okołoodbytovej ch.L-C w remisji stopniowo maleje, podczas gdy w przypadku ADA początkowy efekt jest słabszy, ale za to bardziej stabilny w czasie (100% zamkniętych przetok w 3-letniej obserwacji spośród tych, które uległy zamknięciu w obserwacji krótkoterminowej – badanie ADHERE) [129]. Wynika to najprawdopodobniej z właściwości farmakokinetycznych obu leków. IFX stosowany jest w leczeniu podtrzymującym dożylnie co 8 tygodni, a ADA podskórnie - co 14 dni. W efekcie IFX szybko osiąga wysokie stężenie w organizmie, które następnie sukcesywnie spada do niskich wartości aż do kolejnej dawki leku. Natomiast w przypadku ADA więcej czasu mija do momentu osiągnięcia stężeń terapeutycznych, ale w toku dalszej terapii koncentracja tego przeciwciała w ludzkim ustroju jest bardziej stabilna [113,168-169]. Podsumowując – oba leki różnią się najistotniej w odniesieniu do farmakokinetyki, podczas gdy molekularne mechanizmy

ich działania w świetle aktualnych badań wydają się być identyczne, a efektywność kliniczna - bardzo zbliżona.

Kwestią niezwykle istotną w ocenie skuteczności inhibitorów TNF- $\alpha$  w ch.L-C jest zdefiniowane pojęcia odpowiedzi na terapię. Obecnie dominuje pogląd, że kluczowym elementem świadczącym o efektywności zastosowanej terapii w ch.L-C jest wykazanie endoskopowo gojenia śluzówkowego [170]. Jest to szczególnie istotne w przypadku leków biologicznych, które najsilniej i najszybciej doprowadzają do gojenia się owrzodzeń w przewodzie pokarmowym. Lekami o znacznie słabszym potencjale terapeutycznym w tym zakresie są leki immunosupresyjne z grupy tiopuryn czy metotreksat [171]. Wciąż jednak brak jest jednoznacznych kryteriów definiujących zjawisko gojenia śluzówkowego. Początkowo posługiwano się półilościową skalą, według której gojenie śluzówkowe oceniano jako całkowite (brak owrzodzeń), częściowe (wygojenie ponad 50% stwierdzanych wyjściowo owrzodzeń) lub jego brak (wygojenie mniej niż połowy owrzodzeń) [133,171]. Następnie zaczęto stosować zaprojektowane do oceny aktywności endoskopowej ch.L-C skale. Przykładem może być *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS) [172]. Podstawowym mankamentem CDEIS jest jednak jego złożoność i trudności z wprowadzeniem do codziennej praktyki. Stąd powstała idea uproszczenia skali endoskopowej, co zaowocowało stworzeniem skali SES-CD. Jak wykazały liczne badania, koreluje ona z aktywnością ocenianą przy pomocy CDEIS, a przy tym jest o wiele bardziej praktyczna w zastosowaniu [158]. Odchodzi się aktualnie także od rygorystycznych kryteriów, wedle których za wygojenie się błony śluzowej w ch.L-C uznawano brak jakichkolwiek nadżerek czy owrzodzeń. Uważa się, że najważniejsze jest wykazanie tendencji do gojenia śluzówkowego. Jest to szczególnie ważne u chorych z bardzo aktywnymi zmianami zapalnymi w przebiegu ch.L-C, u których uzyskanie całkowitego wygojenia się śluzówki po okresie indukcyjnego leczenia biologicznego jest niemożliwe. Nie świadczy to jednak o braku skuteczności terapii. Stąd coraz powszechniej, jako kryterium definiujące gojenie śluzówkowe, uznaje się określoną punktacyjnie wartość redukcji aktywności ch.L-C w obrębie stosowanych skal endoskopowych [170-171]. W przypadku skali SES-CD, na podstawie własnych doświadczeń z zastosowaniem leków biologicznych, Rutgeerts i wsp. zaproponowali, żeby za punkt odcięcia uznawać wartość SES-CD  $\leq 5$  [159-160]. Oznacza to, że

dopuszczalna jest obecność zmian zapalnych (w tym także nadżerek czy mniejszych owrzodzeń), ale o nikłym nasileniu. Połączenie uzyskania remisji klinicznej definiowanej jako CDAI<150 oraz efektu gojenia śluzówkowego określane jest mianem tzw. głębokiej remisji [173]. Uważa się, że uwzględnienie obu wymienionych elementów powinno być „złotym standardem” oceny skuteczności terapii biologicznej w ch.L-C. Stąd właśnie kryterium głębokiej remisji (SES-CD≤5 oraz CDAI<150) zostało w niniejszej pracy zastosowane do wskazania chorych, którzy zareagowali bądź nie na indukcyjne leczenie anty-TNF- $\alpha$ .

Drugim natomiast badanym w niniejszej rozprawie doktorskiej aspektem jest ocena wpływu leczenia biologicznego na ekspresję wybranych białek zaangażowanych w proces apoptozy w zależności od zastosowanego leku. Pomimo bowiem, jak wspomniano wyżej, opinii ekspertów i badaczy o braku istotnych różnic w mechanizmach działania IFX i ADA, wciąż badań na ten temat jest mało i zagadnienie to wymaga dalszych analiz [113].

#### *Rola zaburzeń procesu apoptozy w patogenezie ch.L-C*

Aby jednak rozważyć wpływ na apoptozę, jako mechanizmu kluczowego dla skuteczności inhibitorów TNF- $\alpha$ , należy wykazać, że proces ten jest w ch.L-C zaburzony. Dotychczasowe badania na ten temat, a także wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że dochodzi do istotnych nieprawidłowości w nasileniu i regulacji programowanej śmierci komórkowej [88-92,94-95]. Jak wykazano - z jednej strony mamy do czynienia ze słabo wyrażoną apoptozą limfocytów blaszki właściwej (LPL) błony śluzowej jelita grubego w tkankach zmienionych zapalnie. Zjawisko to jest rejestrowane incydentalnie i pozostaje w kontraście z grupą kontrolną (zdrowe jelito grube), gdzie komórki LPL, wykazujące ekspresję aktywnej kaspazy 3, obserwowane były znacznie częściej. Obserwacja ta jest zgodna z dotychczas dominującym poglądem, że LPL w ch.L-C są mniej wrażliwe na występujące w fizjologicznych warunkach bodźce, które stymulują apoptozę gromadzących się w nadmiarze LPL, co zazwyczaj mediowane jest przez interakcję Fas-FasL. Zaburzenie to prowadzi do patologicznej kumulacji komórek swoistej odpowiedzi immunologicznej w blaszce właściwej błony śluzowej i do dalszej eskalacji reakcji zapalnych. Jak jednak wykazano, nieprawidłowości programowanej śmierci komórkowej nie dotyczą

bezpośrednio układu Fas-FasL czy TNF- $\alpha$ -TNFR1, jako że ekspresja Fas i TNFR1 nie różniła się między tkankami zmienionymi chorobowo a grupą kontrolną. Dochodzi natomiast do defektu na poziomie wewnątrzkomórkowym, a główną rolę odgrywają tutaj białka z rodziny Bcl-2. Wykazano wśród chorych z ch.L-C znamienne wyższą ekspresję Bcl-2 oraz znamienne niższą ekspresję Bax w LPL w porównaniu ze zdrową tkanką. Dochodzi więc do istotnej dysproporcji w zakresie białek pro- i antyapoptotycznych na korzyść tych drugich, co wyraża się wyraźnym zmniejszeniem indeksu Bax/Bcl-2 w LPL. Obserwacja ta jest zgodna z dotychczasową wiedzą, udowodniono bowiem, że mechanizmy regulacji homeostazy komórkowej w tkankach zmienionych zapalnie w ch.L-C w zakresie aktywacji szlaku zewnątrzpo pochodnego z udziałem Fas przebiegają prawidłowo, a blokada programowanej śmierci ma miejsce na poziomie mitochondrium [91].

Pozostaje pytanie czy rejestrowane zjawisko jest defektem pierwotnym czy wtórnym. Przeprowadzone do tej pory w tym obszarze tematycznym badania sugerują, że zaburzenia apoptozy LPL w ch.L-C są skutkiem nagromadzenia szeregu cytokin prozapalnych takich, jak IL-6, IL-12 czy TNF- $\alpha$  i osłabienia mechanizmów immunosupresyjnych.

IL-6 działa na LPT poprzez kompleks rozpuszczalnej formy receptora sIL-6R (ang. *soluble IL-6 receptor*) połączonej z białkiem błonowym limfocyty – gp130. Po połączeniu liganda – IL-6 z receptorem, czyli sIL-6R-gp130, dochodzi do wzbudzenia wewnątrzkomórkowego szlaku, w którym uczestniczy czynnik transkrypcyjny STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription*). Ten ostatni pobudza syntezę białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 [7,88,174-177].

IL-12 natomiast w wyniku wzbudzenia szlaku związanego z czynnikiem STAT4 prowadzi do zablokowania wewnątrzkomórkowych etapów indukcji szlaku zewnątrzpo pochodnego apoptozy na poziomie kaspaz inicjatorowych [7,88,178].

TNF- $\alpha$  obecny jest także w dużej ilości w tkankach zmienionych zapalnie. Cytokina ta prowadzi głównie, poprzez interakcję z TNFR1, do stymulacji czynnika NF- $\kappa$ B, który reguluje transkrypcję szeregu genów promujących proliferację komórek. Wtórnie zaangażowane są w te procesy także białka z rodziny Bcl-2, co prowadzi do wzbudzenia mechanizmów antyapoptotycznych [179]. Kolejnym potencjalnym

mechanizmem prowadzącym do osłabienia apoptozy LPL w ch.L-C, związanym ze szlakiem mediowanym przez NF- $\kappa$ B w wyniku działania TNF- $\alpha$ , jest zaburzenie regulacyjnego wpływu komórek i cytokin działających immunosupresyjnie. Wykazano między innymi upośledzenie funkcji komórek regulatorowych Treg, które dużą część swych właściwości zawdzięczają czynnikiowi transformującemu wzrostu TGF- $\beta$ . Udowodniono, w warunkach doświadczalnych, że stymulacja komórek mononuklearnych blaszki właściwej jelita TGF- $\beta$  prowadzi między innymi do zmniejszenia syntezy NF- $\kappa$ B w wyniku pobudzenia przez TNF- $\alpha$  [180].

Wskazane powyżej mechanizmy prowadzące do patologicznej oporności LPL w ch.L-C na programowaną śmierć komórek skutkują tym, że LPL są mniej wrażliwe na szereg proapoptotycznych bodźców. Może być to wynikiem braku gotowości komórek na wejście na szlak apoptozy, której przyczyną jest zaburzony stosunek białek Bax/Bcl-2, co znamienne przedłuża okres przeżycia komórek nacieku zapalnego.

Z drugiej strony wykazano, że komórki nabłonka jelita grubego w tkankach zmienionych zapalnie podlegają zwiększonej eliminacji apoptotycznej w porównaniu z jelitem zdrowym. Zwiększona ekspresja aktywnej kaspazy 3 dotyczyła zarówno nabłonka powierzchniowego, jak i nabłonka krypt, aczkolwiek nieznacznie bardziej dotyczyło to części powierzchniowej. Obserwacja ta była zgodna z oczekiwaniami. Programowana śmierć enterocytów jest bowiem naturalnym zjawiskiem decydującym o zachowaniu równowagi między komórkami, które spełniły już swoją rolę, a tworzącymi się stale nowymi enterocytami w wyniku ich różnicowania się z komórek macierzystych. Proces ten dotyczy pojedynczych komórek i przebiega w warunkach fizjologicznych sprawnie, nie doprowadzając do upośledzenia bariery jelitowej, i jest najbardziej nasilony w szczytowych częściach nabłonka jelitowego. Drugą lokalizacją większej ilości komórek apoptotycznych, ale o mniejszym nasileniu, jest okolica dna krypt jelitowych, gdzie zazwyczaj znajdują się intensywnie dzielące się, ale i obumierające, wspomniane komórki macierzyste [181].

Jak wiadomo, w świetle przewodu pokarmowego są miliardy antygenów, które mają potencjał wzbudzenia reakcji immunologicznych w ścianie przewodu pokarmowego, a o selektywności i efektywności tej odpowiedzi decyduje w pierwszej linii prawidłowa

pod względem strukturalnym i czynnościowym pojedyncza warstwa komórek nabłonka jelita grubego. Jak wykazano, w ch.L-C mamy do czynienia z nasileniem apoptozy często grup wielu enterocytów, a nie pojedynczych komórek. Prowadzi to do zaburzenia struktury i funkcji bariery jelitowej, co skutkuje wzmożoną i niekontrolowaną stymulacją antygenową elementów nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej w głębszych warstwach ściany jelita.

Dotychczasowe badania nad mechanizmami doprowadzającymi do patologicznego nasilenia apoptozy nabłonka w NCHZJ pokazują, że najprawdopodobniej nie jest to pojedynczy defekt [119]. Wyniki niniejszej pracy świadczą o tym, że najprawdopodobniej nie jest tutaj zaangażowany układ Fas-FasL, co znajduje potwierdzenie w literaturze. Nie stwierdza się różnic w ekspresji Fas w enterocytach w miejscach zmienionych zapalnie w ch.L-C w porównaniu z grupą kontrolną. Jak pokazują także inne prace, komórki nabłonkowe nie wykazują ekspresji FasL, co wyklucza wzajemną eliminację enterocytów w mechanizmie apoptozy. Postuluje się natomiast, że ligand dla Fas występuje w dużych ilościach w błonie limfocytów śród nabłonkowych oraz limfocytów blaszki właściwej śluzówki i do nadmiernej eliminacji enterocytów dochodzi w wyniku interakcji nabłonka z komórkami swoistej odpowiedzi immunologicznej. Taki mechanizm postulowano w przypadku WZJG, w którym wykazywano koekspresję Fas w epitelium oraz FasL w limfocytach nacieku zapalnego. Nie odnotowano podobnych zależności w ch.L-C, co więcej w ostatnim czasie także rolę układu Fas-FasL w WZJG poddaje się w wątpliwość [182].

Wyniki niniejszej pracy sugerują, że kluczową rolę w nadmiernej eliminacji enterocytów może odgrywać układ TNF- $\alpha$ -TNFR1 oraz białka z rodziny Bcl-2. Wykazano bowiem znamienne wyższą ekspresję TNFR1 oraz Bax, a także zwiększenie indeksu Bax/Bcl-2 w tkankach zmienionych zapalnie w porównaniu z jelitem zdrowym. Obserwacja ta dotyczy całości nabłonka, ale nieznacznie bardziej nasiloną jest w jej części powierzchniowej.

Można wskazać kilka hipotez tłumaczących zaobserwowane zjawiska. Przede wszystkim komórki nabłonka jelitowego, wciągnięte w kaskadę zjawisk zapalnych, narażone są na szereg czynników uszkodzających. Pierwotnym elementem odpowiedzi immunologicznej są komórki reagujące nieswoiście (głównie neutrofile

obecne w dużych ilościach w nacieku zapalnym w miejscach zmienionych chorobowo). Generują one stres oksydacyjny, obumierając uwalniają enzymy doprowadzające do remodelingu macierzy międzykomórkowej (np. metaloproteinazy, elastazy), prowadzą do lokalnego niedotlenienia tkanek, które funkcjonują w warunkach długu tlenowego [183]. Te wszystkie bodźce mogą aktywować szlak wewnątrzpochodny apoptozy, w którym pośredniczą białka z rodziny Bcl-2.

Innym aktywowanym białkiem związanym bezpośrednio z programowaną śmiercią komórkową jest białko p53. Wykazano bowiem, że ekspresja p53 rośnie znamienne w obrębie zmienionej zapalnie błony śluzowej u chorych z ch.L-C [184]. p53 może w takich sytuacjach promować apoptozę komórek poprzez bezpośredni wpływ na białka Bax i Bcl-2. Z drugiej strony wiadomo, że p53 ma silny potencjał zwiększający ekspresję TNFR1 i wspomaga procesy mediowane poprzez ten receptor [185]. TNFR1 występuje na powierzchni większości komórek jądrzastych ustroju, a pobudzenie tego białka przez TNF- $\alpha$  może prowadzić do szeregu efektów biologicznych. Wydaje się, w świetle dotychczasowych badań, że w nabłonku jelitowym w tkankach zdrowych, interakcja TNF- $\alpha$ -TNFR1 skutkuje aktywacją czynnika NF- $\kappa$ B, który w tych komórkach promuje proliferację, wzmacnia syntezę cytokin prozapalnych, działa antyapoptotycznie [179]. Jednak w warunkach patologicznych, w tkankach zmienionych zapalnie, w których rejestruje się duże stężenia TNF- $\alpha$ , pobudzenie TNFR1 prowadzi raczej do efektu proapoptotycznego [128]. Warto w tym miejscu zauważyć, że enterocyty klasyfikowane są zazwyczaj jako komórki typu II i do pełnej aktywacji apoptozy w szlaku zewnątrzpochodnym mogą wymagać wzmocnienia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Uczestniczy w tym białko rodziny Bcl-2 – Bid, angażujące wtórnie mitochondria w późny etap egzekucji apoptozy [46]. Tak więc we wszystkich zaprezentowanych powyżej mechanizmach dochodzi do interakcji i współistnienia zaburzeń regulacji apoptozy nabłonka jelitowego na poziomie zjawisk mediowanych przez TNFR1 oraz poprzez białka z rodziny Bcl-2.

Podsumowując tę część dyskusji, wykazano w niniejszej pracy, że w tkankach zmienionych zapalnie u pacjentów z ch.L-C dochodzi do nieprawidłowej kumulacji limfocytów w naciekach zapalnych między innymi w wyniku osłabienia ich eliminacji w mechanizmie apoptozy. Defekt ten dotyczy zmniejszenia potencjału

proapoptotycznego LPL w wyniku zaburzeń równowagi białek z rodziny Bcl-2 promujących i hamujących apoptozę na rzecz tych drugich. Stwierdza się także zwiększoną eliminację komórek nabłonka jelitowego, co jest najprawdopodobniej efektem złożonych zaburzeń szlaku zewnątrzpochodnego indukcji programowanej śmierci komórek związanego z TNFR1 oraz zwiększeniem potencjału propapoptotycznego enterocytów, wyrażającym się znamienym wzrostem indeksu Bax/Bcl-2.

*Wpływ przeciwciał anty-TNF- $\alpha$  na ekspresję wybranych białek uczestniczących w procesie apoptozy w odniesieniu do skuteczności terapii biologicznej*

Jak dotąd oceniano wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$  na proces apoptozy w różnych interwałach czasowych – od kilku godzin po zastosowaniu tych leków w badaniach *in vitro* lub na modelach zwierzęcych, do tygodni w przypadku pacjentów z ch.L-C [123]. Aktualnie powszechnie przyjęto, na podstawie badań klinicznych oraz wielu lat doświadczeń w stosowaniu terapii antycytokinowej, że oceny efektywności terapii biologicznej powinno się dokonywać po 3 dawce IFX i po 7 dawce ADA (leczenie indukcyjne) [64]. Taki też schemat przyjęto w niniejszej pracy.

W grupie, w której uzyskano odpowiedź na leczenie biologiczne, zaobserwowano znamiennej redukcję aktywności mikroskopowej, wyrażającą się między innymi zmniejszeniem nacieku zapalnego w blaszce właściwej śluzówki ze spadkiem ilości granulocytów, jak i komórek mononuklearnych (w tym limfocytów). W grupie bez odpowiedzi na terapię aktywność mikroskopowa ch.L-C pozostawała bez istotnych zmian. Tak więc zjawiska, obserwowane na poziomie tkankowym, pozostają w zgodności z tym, co obserwujemy makroskopowo w trakcie endoskopii oraz klinicznie w postaci poprawy symptomatologicznej. Odnotowano istotny spadek ekspresji komórek CD4 (głównie komórki Th) i CD8-pozytywnych (przede wszystkim komórki Tc) wśród chorych w remisji po leczeniu indukcyjnym, co pozostawało w kontraście do pacjentów bez remisji. Obserwacja ta podkreśla ważną, z patogenetycznego punktu widzenia, rolę limfocytów CD4 oraz CD8, które stanowią kluczowy element „napędzający” zjawiska immunologiczne w tkankach zmienionych



zapalnie [186]. Innymi słowy – bez eliminacji reaktywnych komórek CD4 i CD8 w naciekach zapalnych nie udaje się wprowadzić chorego w stan głębokiej remisji.

Jak pokazała analiza ekspresji aktywnej kaspazy 3 w LPL, eliminacja komórek CD4 i CD8 przynajmniej w części zachodzi w wyniku wzbudzenia przez inhibitory TNF- $\alpha$  ich apoptozy. W grupie z odpowiedzią zarejestrowano istotne zwiększenie LPL wchodzących po leczeniu na szlak programowanej śmierci komórkowej, podczas gdy u pacjentów bez odpowiedzi takich zjawisk nie zarejestrowano. Tak więc komórki, które wykazywały oporność na szereg bodźców proapoptotycznych zostały, wskutek zastosowania leków biologicznych, ponownie na nie uwrażliwione.

Dalsza analiza zmiany ekspresji poszczególnych białek pod wpływem terapii antycytokinowej wykazała, że apoptoza ta nie jest mediowana poprzez szlak zewnątrzpochodny, zależny od pobudzenia Fas czy TNFR1, ale jest efektem zmiany indeksu Bax/Bcl-2. Dochodzi bowiem do znamienego spadku ekspresji Bcl-2 i wzrostu ekspresji Bax w LPL pod wpływem leczenia biologicznego. Ekspresja aktywnej kaspazy 3 po leczeniu istotnie koreluje z rosnącym indeksem Bax/Bcl-2. Jest to zgodne z obserwacjami poczynionymi na etapie definiowania zaburzeń mechanizmów apoptotycznych w ch.L-C w odniesieniu do zdrowej tkanki jelit, gdzie zaobserwowano, że to właśnie dysproporcja w zakresie białek z rodziny Bcl-2 odpowiedzialna jest za oporność na apoptozę w LPL.

Można wskazać kilka potencjalnych mechanizmów decydujących o takim, przywracającym, poprzez regulację indeksu Bax/Bcl-2, homeostazę komórkową w tkankach zmienionych zapalnie, wpływie inhibitorów TNF- $\alpha$ . Jak udowodniono, leczenie biologiczne doprowadza do zmniejszenia lokalnej kumulacji szeregu cytokin prozapalnych, w tym TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 czy IL-23 [113]. Można przypuszczać, że, przynajmniej w części, jest to efektem wykazanego zmniejszenia ilości komórek CD4, do których zaliczamy przede wszystkim limfocyty Th (w przypadku ch.L-C głównie Th1 i Th17), odpowiedzialnych za syntezę wymienionych interleukin. Jak wynika z badań Atrei i wsp. i o czym była już mowa, jedną z kluczowych cytokin dla indukcji oporności na apoptozę LPL jest IL-6 [187]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że zastosowanie przeciwciał blokujących IL-6, uniemożliwiających interakcję liganda ze swym kompleksem receptorowym gp130-IL6R zlokalizowanym

w błonie komórkowej LPL, doprowadza do zależnego od zmiany ekspresji Bax/Bcl-2 nasilenia apoptozy reaktywnych LPL. Podobny efekt wywiera także zablokowanie wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego STAT3 pobudzanego przez IL-6 [188]. Świadczy to o kluczowej roli IL-6 w wywoływaniu oporności LPL na sygnały proapoptotyczne. Tak więc zmniejszenie lokalnego stężenia IL-6 w wyniku zastosowania IFX czy ADA odblokowuje możliwości fizjologicznej regulacji długości życia LPL i innych komórek zapalnych w mechanizmie programowanej śmierci między innymi poprzez zwiększenie indeksu Bax/Bcl-2.

Innym potencjalnym mechanizmem jest bezpośrednio zablokowanie TNF- $\alpha$  przez neutralizujące tę cytokinę przeciwciała. Doprowadza to do zahamowania interakcji TNF- $\alpha$  z TNFR1/2, co skutkuje zmniejszeniem syntezy czynnika NF- $\kappa$ B, który działa proliferacyjnie i antyapoptotycznie, wpływając na białka z rodziny Bcl-2 także poprzez zwiększenie indeksu Bax/Bcl-2 [189].

Kolejnymi hipotetycznymi szlakami wzbudzonymi przez inhibitory TNF- $\alpha$  w LPL, które prowadzą do stymulacji apoptozy poprzez wpływ na białka z rodziny Bcl-2, są mechanizmy związane z bezpośrednią interakcją tych przeciwciał z tmTNF. Jak bowiem wykazano, tmTNF cechuje się dużą ekspresją w błonie komórkowej LPL w naciekach zapalnych w ch.L-C [117]. Wiązanie inhibitora TNF- $\alpha$  z tmTNF powoduje, że tmTNF, funkcjonujący w tym przypadku jako receptor, może mediuować procesy prowadzące do programowanej śmierci komórki posiadającej ten receptor. Jednym z tych procesów jest ADCC – cytotoksyczność zależna od przeciwciał, omówiona częściowo w rozdziale 1.4.5.2. Przeciwciało anti-TNF- $\alpha$  wiąże fragmentem Fab tmTNF na LPL, natomiast jego fragment Fc reaguje z receptorem Fc (CD16) komórek NK obecnych w naciekach zapalnych. To stymuluje degranulację zawartości ziarnistości azurofilnych komórek NK, zawierających perforynę i granzym B [116]. Granzym B dostaje się do wnętrza LPL i pośredniczy w enzymatycznym cięciu białka z rodziny Bcl-2 – Bid do postaci tBid. tBid natomiast reaguje z białkiem Bax, które ostatecznie decyduje o wejściu komórki na szlak apoptozy, poprzez wpływ na przepuszczalność błony mitochondrialnej dla cytochromu C [190-191].

Najbardziej jednak interesującą hipotezą, związaną z wpływem anti-TNF- $\alpha$  na tmTNF w komórkach docelowych, jest ta zaproponowana przez Mitomę i wsp [117].

Zakłada ona, że większość swoich modulujących odpowiedzi immunologiczną właściwości inhibitory TNF- $\alpha$  zawdzięczają zjawisku odwrotnej sygnalizacji. Po związaniu tmTNF z anty-TNF- $\alpha$  dochodzi do pobudzenia wewnątrzkomórkowej sygnalizacji, w którą zaangażowane są kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*), a w szczególności szlak kinazy JNK. W wyniku aktywacji kinazy JNK dochodzi do aktywacji białka p53. To natomiast skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego na etapie fazy G0/G1, zależnym od białek p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, kumulacją wolnych rodników tlenowych oraz zwiększeniem ekspresji białek proapoptotycznych Bax i Bak. Całość obserwowanych zjawisk prowadzi do wzbudzenia apoptozy komórki docelowej. Warto w tym miejscu podkreślić, że o ile efekt proapoptotyczny obserwowano w przypadku IFX, podobnych właściwości nie wykazywał etanercept. Wynika to z faktu, że lek ten charakteryzuje bardzo słabe, w przeciwieństwie do IFX i ADA, powinowactwo do tmTNF [113]. Uwzględniając, że etanercept jest lekiem nieskutecznym w ch.L-C, należy wnioskować, że mechanizm indukcji apoptozy LPL przez IFX i ADA może mieć kluczowe znaczenie dla efektywności leków antycytokinowych w tym wskazaniu.

Ocena wpływu przeciwciał anty-TNF- $\alpha$  na nasilenie procesu apoptozy nabłonka wykazała istotne zmniejszenie ekspresji aktywnej kaspazy 3 u chorych z odpowiedzią na terapię. Dotyczyło to zarówno nabłonka powierzchniowego, jak i kryptowego. Co ciekawe, także wśród chorych bez odpowiedzi na leczenie odnotowano spadek nasilenia programowanej śmierci komórkowej enterocytów, niemniej jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie. Świadczyć to może o tym, że proces naprawy bariery śluzówkowej, uszkodzonej w ch. L-C w wyniku reakcji zapalnych, jest po części przynajmniej warunkowany regulacją zbyt silnie wyrażonej wyjściowo eliminacji komórek na drodze apoptozy. Fakt ten ma nie tylko przełożenie na procesy zachodzące w skali mikroskopowej, co przejawia się wykazaniem w niniejszej pracy gojeniem się błony śluzowej, manifestującym się całkowitym zniknięciem u wszystkich pacjentów, opisywanych przed terapią u co trzeciego chorego, nadżerek czy owrzodzeń. Znajduje on także najprawdopodobniej swoje odzwierciedlenie w skali makroskopowej, w postaci ocenianego endoskopowego gojenia śluzówki, które staje się współcześnie głównym celem terapii ch.L-C. Biorąc pod uwagę, co opisywane było wyżej, ważne z punktu widzenia rokowniczego

znaczenie tego zjawiska, regulację procesu apoptozy nabłonka można określić jeden z głównych celów molekularnych terapii antycytokinowej. Zmniejszając nasilenie programowanej śmierci komórkowej i uszczelniając w ten sposób barierę jelitową, zmniejszamy „dopływ” kolejnych bodźców antygenowych do pobudzonych komórek immunokompetentnych w głębszych warstwach błony śluzowej jelita. Przywracana jest także naturalna funkcja enterocytów, które aktywnie uczestniczą w procesach immunologicznych m.in. jako komórki prezentujące antygen.

Analizując mechanizmy, jakie decydują o opisywanym powyżej wpływie regulującym apoptozę nabłonka przez leki biologiczne, należy podkreślić, że zgodnie z przewidywaniami nie są one zależne od układu Fas-FasL. Fas było obecne w większości komórek nabłonka, co jest zgodne z dotychczasową wiedzą, a nasilenie tej ekspresji nie było modulowane przez inhibitory TNF- $\alpha$  [192]. Zaskakujący jest natomiast fakt braku wpływu przeciwciał anti-TNF- $\alpha$  na indeks Bax/Bcl-2. Także ekspresja obu białek z rodziny Bcl-2 oceniana osobno nie zmienia się w toku terapii. Jest to o tyle niespodziewane, że, jak wykazano w niniejszej pracy, w komórkach nabłonka równowaga tych białek jest zaburzona w porównaniu z jelitem zdrowym na korzyść białek proapoptotycznych. Tak więc apoptoza enterocytów znamienne się zmniejsza, podczas gdy ich potencjał proapoptotyczny wyrażony stosunkiem Bax/Bcl-2 pozostaje niezmienny. Co więcej, w grupie bez odpowiedzi na terapię, w której nie zaobserwowano znamiennej redukcji nasilenia programowanej śmierci komórek nabłonka, odnotowano pewne przesunięcia w ekspresji Bcl-2 i Bax, indeks Bax/Bcl-2 pozostał jednak bez istotnych zmian.

Jak więc dochodzi do modulacji apoptozy przez inhibitory TNF- $\alpha$  bez wpływu na białka z rodziny Bcl-2? Być może proces ten jest mediowany poprzez receptor TNFR1. Jak wykazano w niniejszej pracy, ekspresja TNFR1 maleje w toku terapii – zarówno u chorych z odpowiedzią, jak i bez odpowiedzi na terapię. Pewną niewiadomą pozostaje fakt, że zmiana tej ekspresji jest szczególnie silna w podgrupie bez odpowiedzi na leczenie. Niemniej jednak w obu grupach nasilenie ekspresji aktywnej kaspazy 3 po leczeniu koreluje istotnie z TNFR1. Jak do tej pory istnieje, wedle najlepszej wiedzy autora, zaledwie jedna praca, która bada to zjawisko, i potwierdza poczynione tutaj obserwacje. W modelu eksperymentalnego zapalenia jelita zespół Friesa i wsp. wykazał, że IFX oraz ETA zmniejszają apoptozę

komórek nabłonkowych ocenianą metodą TUNEL [128]. Procesy te są mediowane przez receptor TNFR1, co potwierdza fakt, że u myszy, które nie wykazywały ekspresji TNFR1, pomimo wyindukowania zapalenia jelita, nie obserwowano eliminacji komórek nabłonka na drodze apoptozy. Najprawdopodobniej więc IFX oraz ADA poprzez wiązanie sTNF uniemożliwiają interakcję tej cytokiny z TNFR1 i w ten sposób zmniejsza się eliminacja enterocytów na drodze programowanej śmierci komórek.

Warto w tym miejscu podkreślić, że jak do tej pory nie wykazano ekspresji tmTNF na powierzchni komórek nabłonka jelita [116-117]. Być może ten fakt tłumaczy odwrotny wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$  na apoptozę LPL i enterocytów. W przypadku LPL tmTNF jest obecny w obrębie błony komórkowej w nadmiarze, stąd działanie proapoptotyczne na LPL inhibitorów TNF- $\alpha$  wiążących tmTNF – IFX i ADA, a brak takiego działania w przypadku ETA, co omawiane było wyżej. Natomiast w przypadku nabłonka o dominującej roli neutralizacji sTNF w opisywanych mechanizmach antyapoptotycznych może świadczyć także fakt, że również ETA zmniejszał w modelu doświadczalnym apoptozę nabłonka jelitowego, który jak wiadomo ma silny potencjał unieczynnający sTNF (podobnie jak IFX i ADA).

Innym możliwym wytłumaczeniem wpływu terapii anty-TNF- $\alpha$  na regulację apoptozy nabłonka bez udziału białek z rodziny Bcl-2 jest mediowanie tego procesu przez inne mechanizmy. Defekt programowanej śmierci enterocytów jest zapewne bowiem bardziej złożony i nie ogranicza się do roli jednej czy dwóch ścieżek sygnałowych, co zostało także udowodnione w niniejszej pracy i omówione wyżej. Być może więc należy wziąć pod uwagę np. szlak sfingomielinowo-ceramidowy, w którym także może, oprócz klasycznej zewnątrzpochothanej drogi aktywacji apoptozy, uczestniczyć TNFR1 [190,193]. W wyniku pobudzenia tego szlaku dochodzi, wskutek aktywacji sfingomielinaz, do cięcia błonowej sfingomieliny na ceramid i fosfatydylocholinę. Ceramid pełni rolę wtórnego przekaźnika proapoptotycznego aktywując szereg szlaków enzymatycznych (m.in. CAPK – *ceramide-activated protein kinase* czy SAPK/JNK – *stress associated protein kinase/Jun N-terminal kinase*), które wprowadzają komórkę na drogę programowanej śmierci bez udziału białek z rodziny Bcl-2.

Podsumowując tę część dyskusji należy stwierdzić, że o ile przeciwciała anti-TNF- $\alpha$  skutecznie regulują zaburzoną apoptozę enterocytów, to nie doprowadzają do korekcji zaburzonego, w porównaniu ze zdrową tkanką, indeksu Bax/Bcl-2. Dlatego tak ważne jest poznawanie molekularnych mechanizmów działania tej grupy leków. Dzięki temu można ukierunkowywać dalszy rozwój farmakoterapii ch.L-C w stronę takich terapeutyków lub takich kombinacji leków, które w sposób wielokierunkowy przywracają będą do normy zaburzone procesy immunologiczne w NCHZJ. Być może więc zastosowanie dodatkowo farmaceutyku, który wpływać będzie także na indeks Bax/Bcl-2 w komórkach nabłonka jelitowego, da szansę na jeszcze skuteczniejsze ograniczanie zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym, a co za tym idzie – na długotrwałe remisje choroby lub nawet ewentualne trwałe wyleczenie.

Analizując wyjściowe dane obu grup – z odpowiedzią i bez odpowiedzi na terapię biologiczną, pojawia się pytanie o ewentualne różnice pomiędzy obiema grupami. Czy można wskazać parametry, które charakteryzują pacjentów gorzej rokujących, którzy mają mniejsze szansę na osiągnięcie głębokiej remisji dzięki leczeniu antycytokinowemu? Jak pokazała analiza statystyczna nie było różnic między obu grupami w zakresie ekspresji badanych białek. Oznacza to, że chorzy, którzy nie zareagowali na terapię anti-TNF- $\alpha$  nie mieli np. głębiej wyrażonej oporności LPL na apoptozę niż chorzy, których udało się wprowadzić w remisję. Jedynym histologicznym parametrem, który istotnie różnił obie grupy była aktywność mikroskopowa ch.L-C. Tak więc im bardziej nasilone są zniszczenia strukturalne na poziomie tkankowym, tym mniejsza jest szansa na powodzenie leczenia.

W niniejszej pracy podjęto także próbę oceny wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  na procesy apoptozy w tkankach niezmiennych zapalnie. Jak pokazała analiza ekspresji białek, leczenie anti-TNF- $\alpha$  pozostaje bez znamienego wpływu na proces apoptozy w niezmiennych zapalnie błonie śluzowej jelita grubego u chorych na ch.L-C. Można zatem wnioskować, że leki biologiczne neutralizujące TNF- $\alpha$  modulują istotnie programowaną śmierć komórkową jedynie w komórkach poddanych bezpośredniemu działaniu mediatorów stanu zapalnego. Potwierdzają to badania ten Hove i wsp., który badał w warunkach *in vitro* wpływ zastosowania IFX na stymulowane i niepobudzone komórki Jurkat T [121]. Okazało się, że IFX wzbudzał apoptozę jedynie komórek pobudzonych, poprzez wzrost indeksu Bax/Bcl-2, podczas gdy

pozostawał bez wpływu na komórki niepobudzone immunologicznie. Także w badaniu Atrei i wsp. wykazano, że IFX, ADA oraz CER wzbudzają apoptozę limfocytów CD4 tylko, jeśli są one inkubowane razem z stymulującymi je makrofagami CD14, podczas gdy bez nich nie wchodzi na szlak programowanej śmierci komórkowej [130]. Jak wynika więc z niniejszej pracy i co znajduje potwierdzenie w literaturze, kluczowe znaczenie dla efektywnej modulacji apoptozy przez inhibitory TNF- $\alpha$  ma duża aktywność immunologiczna komórek docelowych. Dzięki temu leki antycytokinowe takie, jak IFX czy ADA wywierają swoje działanie selektywnie - przede wszystkim w tkankach zmienionych zapalnie.

Ciekawą obserwacją jest natomiast znamienne zmniejszenie ilości komórek CD4-pozytywnych w tkankach niezmiennych zapalnie pod wpływem przeciwciał anti-TNF- $\alpha$ , przy braku takiej zależności w odniesieniu do komórek CD8. Jak pokazała analiza ekspresji aktywnej kaspazy 3 w LPL, proces ten nie jest efektem wzmożonej apoptozy tych komórek w tkankach. Wydaje się więc, że zmniejszenie liczebności kluczowych elementów reakcji zapalnej w ch.L-C, jakimi są limfocyty CD4, w nieobjętej chorobą odcinku jelita, jest skutkiem innych mechanizmów biologicznych modyfikowanych przez leki antycytokinowe. W grę wchodzi np. apoptoza limfocytów w krwi obwodowej lub zmniejszenie zdolności limfocytów do migracji do tkanek obwodowych poprzez wpływ na ekspresję molekuł adhezji [113].

#### *Wpływ przeciwciał anti-TNF- $\alpha$ na ekspresję wybranych białek uczestniczących w procesie apoptozy w zależności od stosowanego leku*

Jak dotąd nie dokonywano bezpośrednich porównań, przeprowadzanych na tej samej grupie chorych, między IFX a ADA w zakresie skuteczności klinicznej czy mechanizmów ich działania. Dotychczasowa wiedza opiera się na badaniach przeprowadzanych niezależnie – osobno dla obu leków. Podejmowane są próby zestawiania danych na temat ich efektywności, ale wyciągane z nich wnioski obarczone są błędem związanym z różnorodnie zdefiniowanymi populacjami, obejmującymi poszczególne analizy. Jedynie badania dotyczące mechanizmów działania IFX i ADA przeprowadzane *in vitro* cechują się jednorodnością warunków

doświadczalnych i dają, jak na razie, podstawy do formułowania hipotezy o braku istotnych różnic między oboma inhibitorami TNF- $\alpha$ .

W niniejszej pracy podjęto jedną z pierwszych prób bezpośredniego porównania mechanizmów działania IFX i ADA na chorych z ch.L-C. Chorzy zostali podzieleni na dwie grupy w zależności od stosowanego leku. W obu grupach znaleźli się zarówno pacjenci, którzy odpowiedzieli, jak i nie odpowiedzieli na terapię. Celem tej analizy było zbadanie „potencjału” modyfikującego przebieg procesu apoptozy obu leków. Przyglądając się już skuteczności klinicznej obu leków, zwraca uwagę nieznaczna i nieistotna statystycznie przewaga IFX nad ADA – 66,6% vs 50% uzyskanych głębokich remisji. Jak pokazała analiza wpływu obu inhibitorów TNF- $\alpha$  na ekspresję wybranych białek uczestniczących w programowanej śmierci komórek, różnica ta znalazła po części swe odzwierciedlenie w badaniach immunocytochemicznych.

Z jednej strony, bazując na podstawie oceny ekspresji aktywnej kaspazy 3, można stwierdzić, że oba leki istotnie zwiększały odsetek LPL wchodzących w apoptozę. Tak więc potencjał wzbudzania eliminacji reaktywnych komórek immunokompetentnych w naciekach zapalnych zarówno w przypadku IFX, jak i ADA, był ten sam. Warto jednak zauważyć, że o ile IFX znamienne redukował ilość komórek CD4-pozytywnych oraz zmniejszał ilość komórek CD8-pozytywnych, to ADA wykazywał w tym zakresie podobny wpływ, ale nie osiągał on istotności statystycznej. W obu przypadkach wykazano także, że kluczowym mechanizmem decydującym o zwiększeniu ekspresji aktywnej kaspazy 3 w LPL był wpływ na indeks Bax/Bcl-2, podczas gdy nie odnotowywano istotnych zmian w obrębie Fas czy TNFR1. Potwierdza więc to dotychczas poczynione obserwacje, że leki anty-TNF- $\alpha$  – IFX i ADA – modyfikują zaburzone mechanizmy apoptotyczne poprzez korekcję stosunku białek pro- i antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, przez co uwrażliwiają LPL na szereg bodźców pobudzających programowaną śmierć komórek.

Ciekawie przedstawiają się również dane, dotyczące wpływu obu leków na procesy zachodzące w nabłonku. Otóż IFX znamienne zmniejszał ilość komórek apoptotycznych wśród enterocytów, a więc skutecznie „uszczelniał” barierę śluzówkową. Zjawisko to jest, jak opisywano wyżej, związane z istotną redukcją ekspresji TNFR1, a nie zależy od białek Bax, Bcl-2 czy Fas. Natomiast ADA także



zmniejszał ilość enterocytów obumierających wskutek programowanej śmierci komórkowej, ale dotyczyło to głównie nabłonka powierzchniowego, a w przypadku oceny całości nabłonka efekt ten był tylko bliski istotności statystycznej. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w analizie ekspresji pozostałych białek, jako że nie wykazano w podgrupie leczonej ADA znamiennej różnicy w zakresie nie tylko Bax, Bcl-2 czy Fas, ale także TNFR1. Brak istotnego wpływu na modulację apoptozy oraz na poziom ekspresji TNFR1 w nabłonku przez ADA po raz kolejny przemawia za hipotezą, że to właśnie szlaki mediowane przez ten receptor są kluczowe w regulacji programowanej śmierci enterocytów przez przeciwciała anty-TNF- $\alpha$ .

Najprawdopodobniej fakt nieco słabszego wpływu redukującego ilość komórek CD4-pozytywnych w naciekach zapalnych oraz mniejszy potencjał „naprawczy” w odniesieniu do nabłonka sprawił także, że ADA, w przeciwieństwie do IFX, nieznacznie redukował aktywność mikroskopową ch.L-C.

Czy więc rzeczywiście ADA ma mniejszą zdolność wspomnianej „naprawy” uszkodzonego nabłonka w ch.L-C? Czy nieco słabiej niż IFX zmniejsza ilość kluczowych, z punktu widzenia patogenezy stanu zapalnego w ch.L-C, limfocytów CD4? Czy jest lekiem o słabszym potencjale terapeutycznym w ch.L-C, jak wynikałoby ze wstępnej analizy powyższych danych?

Kluczem do odpowiedzi na te pytania jest przyjrzenie się charakterystyce obu podgrup pacjentów – leczonych IFX i ADA. Chorzy ci wyjściowo nie różnili się znacząco w zakresie ekspresji poszczególnych białek, aczkolwiek w podgrupie ADA odnotowywano np. większe nasilenie apoptozy nabłonka (mierzonej obecnością aktywnej kaspazy 3), większą ekspresję Bcl-2 i mniejszą ekspresję Bax w LPL. Można więc stwierdzić, że pacjenci leczenia ADA wykazywali nieco głębiej wyrażony defekt w zakresie apoptozy badanych komórek i mechanizmów o tym decydujących. Korespondowała z tym wyższa (ale nieznacznie) aktywność mikroskopowa przed leczeniem w podgrupie ADA.

Także analiza danych klinicznych i biochemicznych pozwala wskazać na pewne odrębności obu podgrup. Nie stwierdzono żadnych różnic w zakresie podstawowych parametrów kliniczno-biochemicznych (np. CDAI, CRP, SES-CD, OB., HGB czy PLT), poza wyższym wyjściowym stężeniem fibrynogenu wśród leczonych ADA. Jak

pokazała natomiast analiza dotycząca wszystkich chorych, to właśnie stężenie fibrynogenu, CRP oraz PLT były znacząco wyższe wśród pacjentów, którzy następnie nie odpowiedzieli na leczenie antycytokinowe. Stąd też można te parametry, w tym stężenie fibrynogenu, uznać za predyktory braku skuteczności terapii biologicznej w badanej grupie. Innym bardzo ważnym aspektem, który należy wziąć pod uwagę, jest czas trwania choroby pacjentów leczonych IFX i ADA. Jak wykazano, chorzy leczeni ADA chorowali średnio o 2 lata dłużej w momencie rozpoczęcia terapii, aczkolwiek różnica ta nie była statystycznie istotna. Najbardziej prawdopodobnym uzasadnieniem takiego stanu rzeczy jest fakt, że często wciąż IFX, głównie z uwagi na dłuższe doświadczenia z tym lekiem, stosowany jest jako pierwszorazowy lek biologiczny. ADA natomiast bywa lekiem drugiego rzutu, co potwierdza także analizowana grupa badana, w której 5 z 14 pacjentów w podgrupie ADA było w przeszłości leczonych IFX. Natomiast, jak wykazuje szereg publikacji, w tym subanaliza wieloośrodkowego badania dotyczącego skuteczności ADA w ch.L-C – badania CHARM - leki biologiczne są najskuteczniejsze u chorych we wczesnym etapie choroby [144,194]. Dlatego też dłuższy czas trwania schorzenia w momencie włączenia pacjentów do terapii ADA w porównaniu z IFX, jest kolejnym czynnikiem zmniejszającym „szansę” ADA na wywołanie identycznego efektu molekularnego w tkankach, który był udziałem IFX.

Podsumowując tę część dyskusji należy podkreślić, iż mimo że wykazano nieznacznie słabszy efekt regulujący zaburzone mechanizmy apoptozy w ch.L-C przez ADA w porównaniu z IFX, nie można na tej podstawie formułować hipotez o odmiennej sile działania obu leków. Zaobserwowana w niniejszej analizie nieznaczna różnica w zakresie skuteczności klinicznej, a co za tym idzie – różnica w sile (ale nie mechanizmie) modulacji programowanej śmierci komórkowej wynikała najprawdopodobniej z faktu, że chorzy leczeni ADA prezentowali wyjściowo więcej czynników świadczących o zaawansowaniu procesu chorobowego niż pacjenci w grupie IFX.

## 6. WNIOSKI

1. Nasilenie apoptozy limfocytów blaszki właściwej jelita grubego (LPL) w tkankach zmienionych zapalnie u chorych z ch.L-C, mierzone ekspresją aktywnej kaspazy 3, jest istotnie mniejsze w porównaniu z jelitem zdrowym, i wiąże się z zaburzeniem stosunku białek Bax/Bcl-2 oraz jest niezależne od szlaku zewnątrzpochodnego mediowanego przez Fas czy TNFR1.
2. Nasilenie apoptozy enterocytów w tkankach zmienionych zapalnie u chorych z ch.L-C jest istotnie większe w porównaniu z jelitem zdrowym, co jest efektem złożonego defektu programowanej śmierci komórkowej, mogącego mieć związek z dysproporcją białek Bax/Bcl-2 oraz pobudzeniem apoptozy zależnym od TNFR1 w komórkach nabłonka jelitowego.
3. Modułacja zaburzonych mechanizmów programowanej śmierci komórkowej może być kluczowa dla skuteczności terapii biologicznej. Wśród chorych z tzw. głęboką remisją wykazano bowiem, że leki anty-TNF- $\alpha$  regulują zaburzoną apoptozę LPL i enterocytów. Nie zaobserwowano podobnych zjawisk u chorych bez odpowiedzi na leczenie.
4. Wśród chorych z odpowiedzią na terapię obserwuje się wzrost ekspresji aktywnej kaspazy 3 w LPL, zależny od korekcji stosunku Bax/Bcl-2, a niezależny od szlaku zewnątrzpochodnego mediowanego przez Fas czy TNFR1.
5. Wśród chorych z odpowiedzią na terapię obserwuje się spadek ekspresji aktywnej kaspazy 3 w enterocytach, niezależny od stosunku Bax/Bcl-2, a proporcjonalny do zmian ekspresji TNFR1.
6. Leczenie biologiczne redukuje aktywność mikroskopową ch.L-C między innymi poprzez wpływ na zmniejszenie ilości limfocytów CD4 i CD8 w naciekach zapalnych.

7. Regulacyjny wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$  na apoptozę w ch.L-C dotyczy tkanek zmienionych chorobowo – nie zaobserwowano zmian w ekspresji badanych białek w tkankach niezmiennych zapalnie u chorych na ch.L-C.
8. Potencjał indukowania programowanej śmierci komórkowej w odniesieniu do opornych na apoptozę LPL jest podobny w przypadku ADA i IFX i wiąże się ze zmianą stosunku białek Bax/Bcl-2.
9. Potencjał regulacji zaburzonej apoptozy nabłonka jest większy w przypadku IFX, niemniej jednak zidentyfikowano czynniki świadczące o niepełnej jednorodności klinicznej i biochemicznej pacjentów leczonych ADA i IFX, co uniemożliwia ostateczną analizę porównawczą siły działania obu leków w omawianym aspekcie.

## 7. STRESZCZENIE

Apoptoza jest procesem współdecydującym o zachowaniu ustrojowej homeostazy. Bierze udział m.in. w ograniczaniu wzbudzonej reakcji zapalnej poprzez programowaną śmierć komórek w niej uczestniczących. Istnieje szereg mechanizmów doprowadzających do indukcji apoptozy. Część z nich zależy od interakcji białek, takich jak na przykład FasL czy TNF- $\alpha$ , z receptorami śmierci zlokalizowanymi na powierzchni komórek docelowych (odpowiednio Fas, TNFR1/TNFR2). Jest to tzw. szlak zewnątrzpochodny. W innych przypadkach apoptoza wzbudzana jest przy udziale mechanizmów wewnątrzkomórkowych, w których kluczową rolę odgrywają białka pro- i antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 – np. Bax czy Bcl-2. Ten szlak nazywamy wewnątrzpochodnym. W niektórych sytuacjach oba wymienione szlaki mogą się jednak wzajemnie uzupełniać. Ostatecznym efektem pobudzenia obu ścieżek sygnałowych jest aktywacja kaskady kaspaz, spośród których kluczową, egzekucyjną rolę odgrywa kaspaza 3, co doprowadza do uporządkowanej śmierci komórki.

Zaburzenia procesu apoptozy leżą u podstaw patogenezy wielu jednostek chorobowych, w tym choroby Leśniowskiego-Crohna (ch. L-C). Dlatego istnieją przesłanki teoretyczne do oceny roli regulacji zaburzonej apoptozy komórkowej poprzez nowe, silnie modulujące zjawiska immunologicznie leki, stosowane w terapii ch.L-C – przeciwciała anti-TNF- $\alpha$  (tzw. leczenie biologiczne). Celem pracy była ocena wpływu inhibitorów TNF- $\alpha$  – infliksymabu (IFX) i adalimumabu (ADA) - na nasilenie apoptozy limfocytów blaszki właściwej błony śluzowej jelita (LPL) oraz enterocytów, z uwzględnieniem mechanizmów biorących w tych zjawiskach udział.

Grupę badaną stanowiło 35 osób chorujących na ch.L-C, u których wyczerpano możliwości innych form terapii zachowawczej. U wszystkich pacjentów wykonywano kolonoskopię z pobraniem wycinków do analizy histologicznej dwukrotnie: przed leczeniem oraz po zakończeniu terapii indukcyjnej. Wycinki pobierane były z miejsc zmienionych i niezmienionych zapalnie. W 5 przypadkach materiałem badawczym uzyskanym po terapii były preparaty operacyjne – dotyczyło to wybranych chorych, którzy nie uzyskali odpowiedzi na terapię

i poddani byli zabiegowi operacyjnemu. Tkankę kontrolną stanowiło zdrowe jelito grube (n=10).

Oceniano ekspresję aktywnej kaspazy 3, jako markera apoptozy oraz cząsteczek CD4, CD8, Fas, TNFR1, Bax i Bcl-2 w LPL oraz komórkach nabłonka metodami immunocytochemicznymi. Ponadto przeprowadzono barwienie H+E skrawków tkankowych celem oceny aktywności zmian histologicznych z użyciem zwalidowanej skali mikroskopowej. Zmiana aktywności choroby pod wpływem zastosowanej terapii oceniana była klinicznie (CDAI – ang. *Crohn's disease activity index*) oraz endoskopowo (skala SES-CD – ang. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*). Odpowiedź na leczenie definiowano jako CDAI<150 oraz SES-CD≤5 punktów, co oznaczało tzw. głęboką remisję.

21 chorych leczonych było IFX, a 14 – ADA. Spośród 35 chorych u 21 uzyskano głęboką remisję w wyniku zastosowania terapii anty-TNF- $\alpha$ , co stanowiło 60% grupy badanej.

Wykazano istotne zaburzenia w zakresie programowanej śmierci komórek w badanej grupie w porównaniu ze zdrową tkanką jelita grubego. LPL charakteryzowały się zmniejszonym nasileniem apoptozy, co wiązało się z zaburzeniem w stosunku białek Bax/Bcl-2, a było niezależne od zmian ekspresji Fas czy TNFR1. Natomiast enterocyty charakteryzowały się nadmiernie wyrażoną apoptozą w porównaniu z grupą kontrolną i procesy te związane były zarówno z dysproporcją białek Bax/Bcl-2, jak i mogły być mediowane w szlaku zewnątrzpoходnym wynikającym z pobudzenia TNFR1.

Leczenie anty-TNF- $\alpha$  doprowadziło do redukcji aktywności mikroskopowej ch.L-C z istotnym zmniejszeniem ilości limfocytów CD4 i CD8 w bioptatach. Zaobserwowano zwiększenie odsetka LPL wykazujących ekspresję aktywnej kaspazy 3 wśród chorych z odpowiedzią na terapię. Procesy te wiązały się z korygującym przez inhibitory TNF- $\alpha$  wpływem na indeks Bax/Bcl-2, a były niezależne od mechanizmów związanych z aktywacją Fas czy TNFR1. Wykazano ponadto zmniejszenie eliminacji enterocytów pod wpływem terapii na drodze apoptozy, proporcjonalne do zmian ekspresji TNFR1, a niezależne od białek Bax/Bcl-2 czy Fas. Nie zaobserwowano podobnych, regulujących zaburzoną

programowaną śmierć komórek, zjawisk wśród chorych bez odpowiedzi na leczenia biologiczne. Wykazano także, że wpływ modulujący apoptozę LPL czy enterocytów dotyczył tylko tkanek zmienionych zapalnie, a nie odnotowano podobnych procesów w biopsjach niezmiennych chorobowo.

Potencjał indukowania apoptozy LPL przez oba leki był zbliżony i zależał od wpływu na indeks Bax/Bcl-2. IFX charakteryzował się nieznacznie większym potencjałem zmniejszania apoptozy enterocytów, ale zaobserwowana różnica najprawdopodobniej wynikała z niepełnej homogenności grup chorych leczonych ADA i IFX.

Wyniki niniejszej pracy wykazały, że regulacja zaburzonych mechanizmów apoptotycznych stanowi kluczowy mechanizm molekularny decydujący o skuteczności terapii anty-TNF- $\alpha$  w ch.L-C. Dochodzi do eliminacji opornych wyjściowo na bodźce proapoptotyczne LPL oraz do uszczelnienia bariery jelitowej w wyniku zmniejszenia eliminacji komórek nabłonka. Prowadzi to do ograniczenia zmian patologicznych na poziomie mikroskopowym (aktywność histologiczna) oraz makroskopowym (aktywność endoskopowa), co skutkuje poprawą symptomatologiczną.

## 8. SUMMARY

Apoptosis plays an important role in regulating physiological homeostasis. For instance, it downregulates the number of inflammatory cells in inflamed tissues, preventing uncontrolled tissue damage. Several mechanisms can provoke apoptosis. In some cells, programmed cell death is stimulated by proteins, such as FasL or TNF- $\alpha$ , binding to the death receptors of target cells (Fas and TNFR1/2 respectively). This mechanism is referred to as the extrinsic pathway. In other situations, intracellular triggers induce apoptosis; this is a result of the function of pro- and anti-apoptotic proteins like Bax or Bcl-2, belonging to the Bcl-2 protein family (the intrinsic pathway). Moreover, in certain cases both pathways cooperate influencing each other. The final stage in the mechanism of apoptosis is the induction of a caspase cascade with the activation of the crucial, executive caspase 3, which ultimately leads to cellular fragmentation and death.

The dysfunction of apoptosis plays an important role in the pathogenesis of many illnesses, one of which is Crohn's disease (CD). Therefore, it seems crucial to investigate whether the mechanism of action of TNF- $\alpha$  inhibitors (biological treatment) – a novel group of drugs which interfere with many immunological processes – could prove of importance in the regulation of the disturbed programmed cell death in CD. Hence, the aim of the study was to assess the influence of TNF- $\alpha$  inhibitors – infliximab (IFX) and adalimumab (ADA) – on the apoptotic pathways of lamina propria lymphocytes (LPL) and enterocytes in CD patients.

The study group consisted of 35 patients who had earlier been treated ineffectively with the use of other drug groups. In each case, colonoscopy with tissue sampling for histological evaluation was conducted twice: before treatment and after the induction phase of biological treatment. Tissue biopsies were taken both from inflamed and non-inflamed mucosa. In the case of 5 patients who did not respond to anti-TNF therapy and required surgical intervention, histological analysis was carried out on specimens obtained during surgery. Colonic mucosa attained from healthy individuals (n=10) was used as control tissue.



In the study, using immunocytochemistry, we assessed the expression of activated caspase 3, which was taken to be a marker of apoptosis, as well as the expression of CD4, CD8, Fas, TNFR1, Bax and Bcl-2 in LPL and in enterocytes. Routine H+E staining was also performed to evaluate the microscopic activity of CD using an appropriate scale. The clinical assessment was performed by calculating the Crohn's disease activity index (CDAI), and endoscopic activity was assessed using Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD). Response to treatment was defined as deep remission in patients who achieved CDAI<150 and SES-CD≤5 pts.

All in all, 21 patients were treated with IFX, and 14 with ADA. Following the induction phase of biological treatment, 21/35 (60%) patients were in deep remission.

Compared to healthy tissue samples, apoptosis was disturbed in CD patients. The apoptotic potential of LPL was decreased due to a Bax/Bcl-2 imbalance, and it was independent of the differences in Fas or TNFR1 expression. On the other hand, enterocytes underwent programmed cell death more frequently in the study group, which was probably mediated by TNFR1 signalling, and/or due to a Bax/Bcl-2 imbalance.

The administration of TNF-inhibitors lead to a decrease of the microscopic activity of CD, with an important reduction in the number of CD4 and CD8 lymphocytes in inflamed tissues. Among patients with deep remission, a significant increase was noted in the cleaved caspase 3 expression in LPL, which confirms the induction of apoptosis in these cells. This phenomenon was probably caused by a correction of the impaired Bax/Bcl-2 ratio in LPL, and was independent of Fas or TNFR1 signalling. In patients who did not display deep remission after the induction of biological treatment, similar findings were not observed – hence, LPL apoptosis was not induced. There was also no change in the expression of the investigated proteins in the colonic specimens attained from the uninflamed mucosa of CD patients after anti-TNF therapy.

Both drugs – IFX and ADA – had a similar potential in inducing LPL apoptosis in inflamed tissues, which was a result of the correction of the Bax/Bcl-2 ratio. IFX

was slightly more potent in decreasing enterocyte apoptosis; however, this was probably a consequence of the lack of total clinical and biochemical homogeneity of the groups treated with IFX and ADA.

The results of this study demonstrate that the regulation of disturbed apoptosis is an essential molecular mechanism determining the efficacy of anti-TNF therapy in CD. TNF-inhibitors induce the apoptosis of apoptosis-resistant LPL and decrease programmed cell death of enterocytes tightening the mucosal barrier. Consequently, these phenomena lead to an improvement in microscopic (histologic) and endoscopic activity, thus, providing clinical remission.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
2. Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* 1992; 6: 2450-6.
3. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-19.
4. Marx J. Nobel prize in physiology or medicine. Tiny worm takes a star turn. *Science* 2002; 18: 298(526).
5. Wójcik C. Apoptoza. W: *Seminaria z cytofizjologii: podręcznik dla studentów medycyny, weterynarii i biologii*. Kawiak J, Zabel M (red.). Urban & Partner, Wrocław 2002: 88-102.
6. Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol* 2011; 73: 401-7.
7. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* 2007; 56: 293-303.
8. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-54.
9. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23: 73-87.
10. Hall PA, Coates PJ, Ansari B i wsp. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-77.
11. Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH i wsp. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 277-85.
12. Fas SC, Fritzsching B, Suri-Payer E i wsp. Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* 2006; 9: 1-17.
13. Malejczyk J. Mechanizmy cytotoxyczności limfocytów. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2004: 277-87.
14. Okłota M, Myśliwiec J, Górską M. Contribution of apoptosis to pathogenesis of type 1 diabetes. *Pol Arch Med Wewn* 2005; 113: 179-84.
15. Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G i wsp. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 496-501.
16. Calissano P, Matrone C, Amadoro G. Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Commun Integr Biol* 2009; 2: 163-9.
17. De Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 737-49.
18. Zivny J, Klener P, Pytlik R i wsp. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 11-33.

19. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T i wsp. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 413-24.
20. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 255-60.
21. Gołąb J, Jakóbsiak M, Zagożdżon R i wsp. Cytokiny. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2004: 198-248.
22. Fujita T, Srinivasula SM. Ubiquitination and TNFR1 signaling. *Results Probl Cell Difer* 2009; 49: 87-114.
23. Eum HA, Vallabhaneni R, Wang Y i wsp. Characterization of DISC formation and TNFR1 translocation to mitochondria in TNF- $\alpha$  treated hepatocytes. *Am J Pathol* 2011; 179: 1221-9.
24. Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol* 2002; 22: 185-94.
25. Gupta S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR1 and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol* 2002; 37: 293-9.
26. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kB pathway. *FEBS J* 2011; 278: 862-76.
27. Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 2000; 10: 169-77.
28. Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 536-44.
29. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of Fas receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009; 30: 180-92.
30. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC i wsp. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 207-20.
31. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-92.
32. Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol* 2010; 37: 1361-78.
33. Scoumanne A, Harms KL, Chen X. Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1178-85.
34. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001; 292: 624-6.
35. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria – specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 532-9.

36. Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008; 60: 390-7.
37. Willis SN, Adams JN. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 617-25.
38. Chipuk JE, Green DR. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 2008; 18: 157-64.
39. Fan TJ, Han LH, Cong RS i wsp. Caspase family proteases and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 37: 719-27.
40. Marzo I, Brenner C, Zamzami N i wsp. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondria control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-31.
41. Landes T, Martinou JC. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 540-5.
42. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2005; 12: 857-68.
43. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 2010; 123: 3209-14.
44. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 95-100.
45. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A i wsp. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675-87.
46. Ozoren N, El-Deiry WS. Defining characteristics of types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 2002; 4: 551-7.
47. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M i wsp. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-90.
48. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313-9.
49. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB LIFE USA* 2000; 50: 85-90.
50. Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c- induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1046-56.
51. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H i wsp. Pro-caspase 3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998; 273: 27084-90.
52. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1104-14.

53. Alenzi FQ, Lofty M, Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 271-80.
54. Sattar R, Ali SA, Abbasi A. Molecular mechanism of apoptosis: prediction of three-dimensional structure of caspase-6 and its interactions by homology modeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 497-504.
55. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 21-4.
56. Oberhammer FA, Hochegger K, Froschl G i wsp. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol* 1994; 126: 827-37.
57. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol* 2010; 53: 77-87.
58. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Science* 1998; 281: 96-9.
59. Groen A, Romero MR, Kunne C i wsp. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* 2011; 141: 1927-37.
60. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K i wsp. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44: 205-21.
61. Plenchette S, Filomenko R, Logette E i wsp. Analyzing markers of apoptosis in vitro. *Methods Mol Biol* 2004; 281: 313-31.
62. Bartnik W. Wytuczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2007; 2 (5).
63. Cosnes J. Crohn's disease phenotype, prognosis, and long-term complications: what to expect? *Acta Gastroenterol Belg* 2008; 71: 303-7.
64. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease. *JCC* 2010; 4: 7-101.
65. Hamon JF, Cosnes J, Carbonnel F i wsp. The risk of extra-colonic extension in Crohn's disease. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 1993; 29: 1-10.
66. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P i wsp. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785-94.
67. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M i wsp. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 699-706.

68. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV Jr, Colombel JF i wsp. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 471-78.
69. Sachar DB, Bodian CA, Goldstein ES i wsp. Is perianal Crohn's disease associated with intestinal fistulization? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1547-49.
70. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS i wsp. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in population-based cohort. *Gastroenterology* 2010; 139: 1147-55.
71. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Perianal Crohn's disease: classification and clinical evaluation. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 959-62.
72. Von Roon AC, Reese G, Teare J i wsp. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 839-55.
73. Veloso FT. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: do they influence treatment and outcome? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2702-7.
74. Yapp TR, Stenson R, Thomas GA i wsp. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 907-11.
75. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH i wsp. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 601-6.
76. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K i wsp. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1424-29.
77. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW i wsp. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1559-68.
78. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS i wsp. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 254-61.
79. Chouraki V, Savoye G, Dauchet L i wsp. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2005). *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 33: 1133-42.
80. Neumann MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translational Research* 2007; 149: 173-86.
81. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1704-12.
82. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1720-8.

83. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1729-37.
84. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1756-67.
85. Sakuraba A, Sato T, Kamada N i wsp. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn;s disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 1736-45.
86. Stober W, Fuss IJ, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-21.
87. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-5.
88. Neurath MF, Finotto S, Fuss IJ i wsp. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22: 21-6.
89. Boirivant M, Pica R, De Maria R i wsp. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2616-22.
90. Boirivant M, Marini M, Di Felice G i wsp. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 557-65.
91. Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1556-8.
92. Sturm A, Leite AZ, Danese S i wsp. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 1624-31.
93. Seidelin JB, Nielsen OH. Attenuated apoptosis response to Fas-ligand in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1623-9.
94. Itoh J, de la Motte C, Strong SA i wsp. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 35-41.
95. Ina K, Itoh J, Fukushima K i wsp. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999; 163: 1081-90.
96. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC i wsp. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011; 140: 1768-75.
97. Iwamoto M, Koji T, Makiyama K i wsp. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-9.
98. Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N i wsp. High Fas ligand expression on lymphocytes In lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998; 43: 48-55.



99. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O i wsp. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1498-1507.
100. Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE i wsp. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73.
101. Radwan P. Leczenie farmakologiczne choroby Leśniowskiego-Crohna. W: *Choroba Leśniowskiego-Crohna – 100 lat diagnostyki i terapii*. Rydzewska G, Małecka-Panas E (red.). Wydawnictwo Medyczne Termedia 2008: 113-130.
102. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009; 136: 1182-97.
103. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007; 369: 1641-57.
104. Cosnes J, Nion-Larmuier I, Beaugerie L i wsp. Impact of the increasing immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005; 54: 237-41.
105. Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 948-54.
106. Cosnes J, Cattan S, Blain A i wsp. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 244-50.
107. Hommes D, Beart F, Van Assche G i wsp. A randomized controlled trial evaluating the ideal medical management for Crohn's disease: top-down versus step-up strategies. *Gastroenterology* 2005; 128 (suppl 2): A577.
108. Baert F, Caprilli R, Angelucci E. Medical therapy for Crohn's disease: top-down or step-up? *Dig Dis* 2007; 25: 260-6.
109. D'Haens G. Top-down therapy for Crohn's disease: rationale and evidence. *Acta Clin Belg.* 2009; 64: 540-6.
110. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I i wsp. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 650-6.
111. Lakatos PL, Czegledi Z, Szamosi T i wsp. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid Or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3504-10.
112. Shergill AK, Terdiman JP. Controversies in the treatment of Crohn's disease: the case for an accelerated step-up treatment approach. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2670-7.
113. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH i wsp. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Therapeut* 2008; 117: 244–79.

114. Jakóbiński M. Przeciwciała. W: Immunologia. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN 2004: 25-34.
115. Chowers Y, Sturm A, Sans M i wsp. Report of the ECCO workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Biological roles and effects of TNF and TNF antagonists. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 367-76.
116. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S i wsp. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010; 49: 1215-28.
117. Mitoma H, Horiuchi T, Hata N i wsp. Infliximab induces potent anti inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- $\alpha$ . *Gastroenterology* 2005; 128: 376-92.
118. Baert FJ, D'Haens G, Peeters M I wsp. Tumor necrosis factor  $\alpha$  antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 22-8.
119. Luger A, Lebedz P, Koch S i wsp. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann NY Acad Sci* 2006; 1072: 62-77.
120. Luger A, Schmidt M, Luger N i wsp. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001; 121: 1145-57.
121. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP i wsp. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 206-11.
122. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR i wsp. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 1774-85.
123. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B i wsp. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 70-7.
124. Kanayama K, Nakamura K, Ogino H i wsp. Th1 responses are more susceptible to infliximab-mediated immunosuppression than Th17 responses. *Dig Dis Sci* 2011; published online 16 June 2011.
125. Shen C, Van Assche G, Colpaert S i wsp. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 251-8.
126. Ferkolj I, Ihan A, Markovic S i wsp. Infliximab reduces the number of activated mucosal lymphocytes in patients with Crohn's disease. *J Gastrointestinal Liver Dis* 2006; 3: 231-5.
127. Zeissig S, Bojarski C, Bürgel N i wsp. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumor necrosis factor  $\alpha$  antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302.
128. Fries W, Muja C, Crisafulli C i wsp. Infliximab and etanercept are equally effective in reducing enterocyte apoptosis in experimental colitis. *Int J Med Sci* 2008; 5: 169-180.

129. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M i wsp. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1323-32.
130. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B i wsp. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF Receptor 2 and intestinal CD14+ macrophages. *Gastroenterology* 2011; 141: 2026-38.
131. Adamski Z, Linke K, Samborski W (red.). Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii. Termedia Wydawnictwo Medyczne 2010: 219-82.
132. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ i wsp. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastro* 2011; advance online publication 15 March 2011.
133. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH i wsp. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. *N Eng J Med* 1997; 337: 1029-35.
134. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S i wsp. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 761-70.
135. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M i wsp. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut* 2009; 58: 492-500.
136. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W i wsp. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 1383-95.
137. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M i wsp. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 433-42.
138. Rutgeerts P, Diamond R, Bala M i wsp. Long-term safety of infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: a single-centre cohort study. *Gut* 2009; 58: 501-8.
139. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR i wsp. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomized trial. *Lancet* 2002; 359:1541-9.
140. Lichtenstein GR, Yan S, Bala M i wsp. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128: 862-9.
141. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG i wsp. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-76.
142. Ferrante M, Vermeire S, Fidder H i wsp. Long-term outcome after infliximab for refractory ulcerative colitis. *JCC* 2008; 2: 219-25.
143. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009; 136:1182-97.

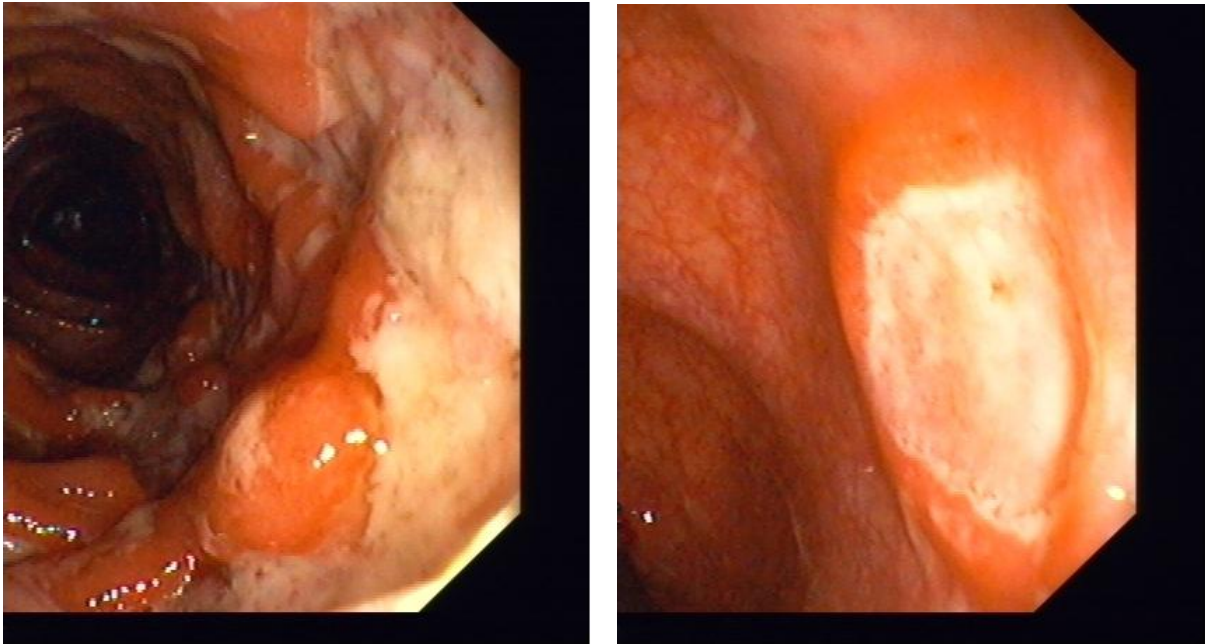
144. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P i wsp. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (Adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I Trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 323–33.
145. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P i wsp. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II Trial. *Gut* 2007; 56: 1232-9.
146. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P i wsp. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's Disease: the CHARM Trial. *Gastroenterology* 2007; 132: 52–65.
147. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ i wsp. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Gastroenterology* 2008; 135 : 1493-9.
148. Schreiber S, Feagan BG, Sandborn WJ i wsp. Effects of adalimumab therapy on major surgery in Crohn's disease: results from a randomized controlled trial. 16<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Vienna, Austria, 18-22.10.2008: P0773.
149. Colombel JF. Efficacy and safety of adalimumab for the treatment of Crohn's disease in adults. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008; 2: 163-76.
150. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R i wsp. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 829-38.
151. Panaccione R, Colombel JF, Sandborn WJ i wsp. Adalimumab maintains long-term remission in moderately to severely active Crohn's disease through 3 years of therapy. 4<sup>th</sup> Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Congress, Hamburg, Germany, 5-7.02.2009: P148. *JCC* 2009; 3: S69.
152. Peyrin-Biroulet L, Laclotte C, Roblin X i wsp. Adalimumab induction therapy for ulcerative colitis with intolerance or lost response to infliximab: An open-label study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2328-32.
153. Reinisch W, Sandborn WJ, Hommes DW i wsp. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis. 5<sup>th</sup> Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Congress, Prague, Czech Republic, 25-27.02.2010: P7. *JCC* 2010; 4: S5.
154. Colombel JF, Loftus Jr EV, Tremaine WJ i wsp. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology* 2004; 126: 19-31.
155. Hoentjen F, Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2067-73.
156. Treść Programu Terapeutycznego "Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna 2010", Narodowy Fundusz Zdrowia 2010. Źródło: [www.nfz.gov.pl](http://www.nfz.gov.pl).
157. Best WR, Beckett JM, Singleton JW i wsp. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-44.
158. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G i wsp. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 505-12.

159. Rutgeerts P, Thakkar R, Kaltenboeck A i wsp. Mucosal healing predicts quality-of-life benefits for adalimumab-treated patients with Crohn's disease. 5<sup>th</sup> Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Congress, Prague, Czech Republic, 25-27.02.2010: P66. JCC 2010; 4: S40.
160. Rutgeerts P, Thakkar R, Kaltenboeck A i wsp. Mucosal healing predicts long-term clinical benefits for adalimumab-treated patients with Crohn's disease. 5<sup>th</sup> Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Congress, Prague, Czech Republic, 25-27.02.2010: P61. JCC 2010; 4: S37.
161. Sterzyńska K. Immuno- i hybrydo cytochemiczna analiza ekspresji interleukiny 2 (IL-2) i jej receptora (IL-2R) w nowotworach płuc. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, 2010r.
162. D'Haens G, Geboes K, Peeters M i wsp. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114: 262-67.
163. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use a avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
164. Zabel M (red.). *Immunocytochemia*. PWN 1999: 1-380.
165. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den Immunohistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammikarzinomgewebe. *Pathologie* 1987; 8: 138-40.
166. Hofmann M, Stoss O, Shi D i wsp. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805.
167. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G i wsp. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010; 457: 299-307.
168. Nestorov I. Clinical pharmacokinetics of tumor necrosis factor antagonists. *J Rheumatol* 2005; Suppl 74: 13-18.
169. Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Bose S i wsp. Comparison of affinities, avidities and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* 2009; 131: 308-16.
170. Feagan B, Lemann M, Befrits R i wsp. Recommendations for the treatment of Crohn's disease with tumor necrosis factor antagonists: an expert consensus report. *Inflamm Bowel Dis* 2011; Oct 29; [Epub ahead of print].
171. Baert F, Moortgat L, Van Assche G i wsp. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010, 138: 463-8.
172. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study: Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* 1998; 30: 983-9.
173. Ha C, Kornbluth A. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 471-8.

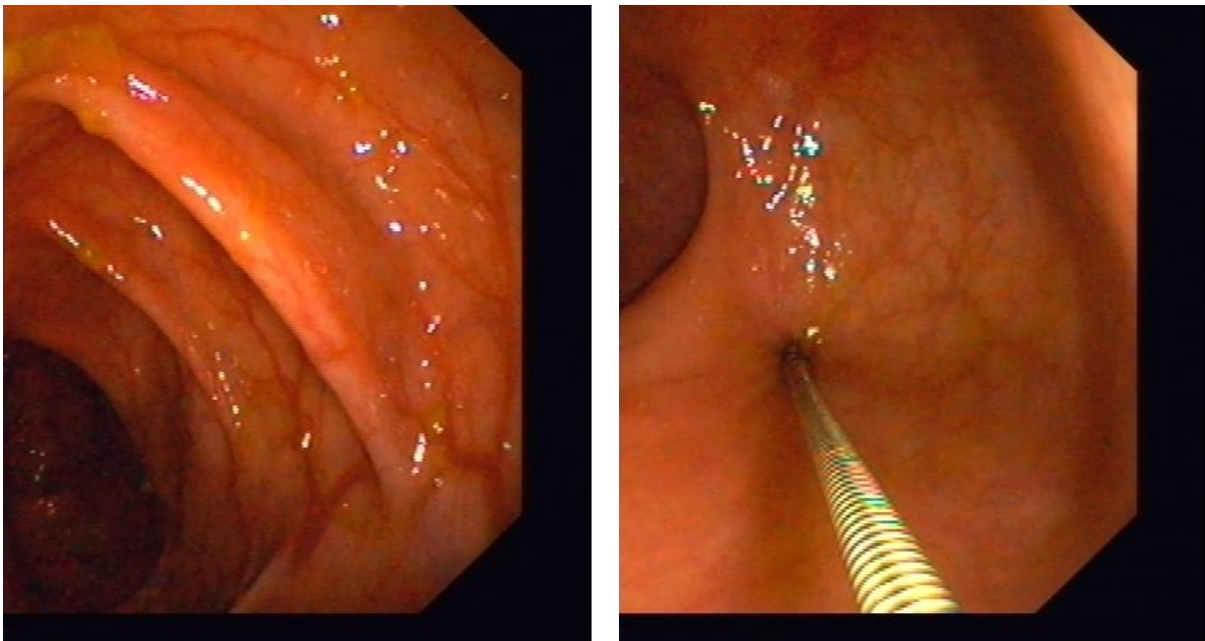
174. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T i wsp. IL-6 is required for the development of Th1 cell mediated murine colitis. *J Immunol* 2000; 164: 4878-82.
175. Jones SA, Richards PJ, Scheller J i wsp. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 241-53.
176. Ito H. IL-6 and Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2: 125-30.
177. Mudter J, Weigmann B, Bartsch B i wsp. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72.
178. Palmer EM, Farrokh-Siar L, van Deventer MJ i wsp. IL-12 decreases activation-induced cell death in human naïve Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001; 167: 749-58.
179. Edelblum KL, Goettel JA, Koyama T i wsp. TNFR1 promotes tumor necrosis factor-mediated mouse colon epithelial cell survival through RAF activation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Biochem* 2008; 283: 29485-94.
180. Monteleone G, Mann J, Monteleone I i wsp. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem* 2004; 279: 3925-32.
181. Watson A, Pritchard M. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G1-G5.
182. Strater J, Moller P. CD95 (Fas/APO-1)/CD95L in the gastrointestinal tract: fictions and facts. *Virchows Arch* 2003; 442: 218-25.
183. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and metabolic factors that influence inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2011; 140: 1748-55.
184. Alkim C, Savas B, Ensari A i wsp. Expression of p53, VEGF, microvessel density, and cyclin-D1 in noncancerous tissue of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1979-84.
185. Huang Y, Tan M, Gosink M i wsp. Histone deacetylase 5 is not a target gene, but its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis. *Cancer Res* 2002; 62: 2913-22.
186. Dotan I, Allez M, Nakazawa A i wsp. Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon- $\gamma$ . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1630-40.
187. Atreya R, Mudter J, Finotto S i wsp. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 583-8.
188. Ito H, Horitani T, Yamamoto M i wsp. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002; 37 (Suppl 14): 56-61.

189. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 591-6.
190. Stępień A, Izdebska M, Grzanka A. Rodzaje śmierci komórek. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; 61: 420-8.
191. MacDonald G, Shi L, Vande Velde C i wsp. Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med* 1999; 189: 131-44.
192. Chen L, Park SM, Turner JR i wsp. Cell death in the colonic epithelium during inflammatory bowel diseases: CD95/Fas and beyond. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1071-6.
193. Perry DK. Ceramide and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 399-404.
194. Sandborn WJ, Panaccione R, Thakkar R i wsp. Duration of Crohn's disease affects mucosal healing in adalimumab-treated patients: results from EXTEND. 5<sup>th</sup> Congress of the European Crohn's and Colitis Organization Congress, Prague, Czech Republic, 25-27.02.2010: P61. *JCC* 2010; 4: S36.

## 10. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

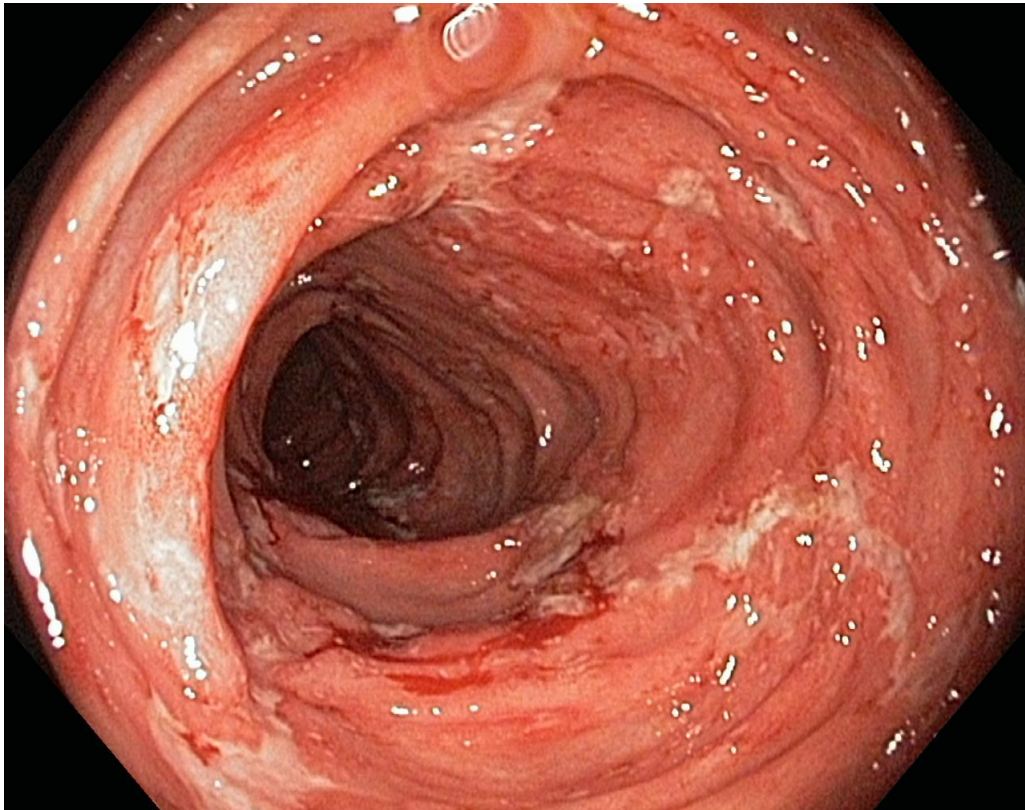


Fot.1 Aktywne zmiany zapalne w obrazie kolonoskopowym w obrębie jelita grubego w przebiegu ch.L-C – widoczne liczne, głębokie owrzodzenia w obrębie błony śluzowej, rozpulchnienie śluzówki z zatarciem rysunku siatki naczyń, miejscami błona śluzowa prawidłowa.

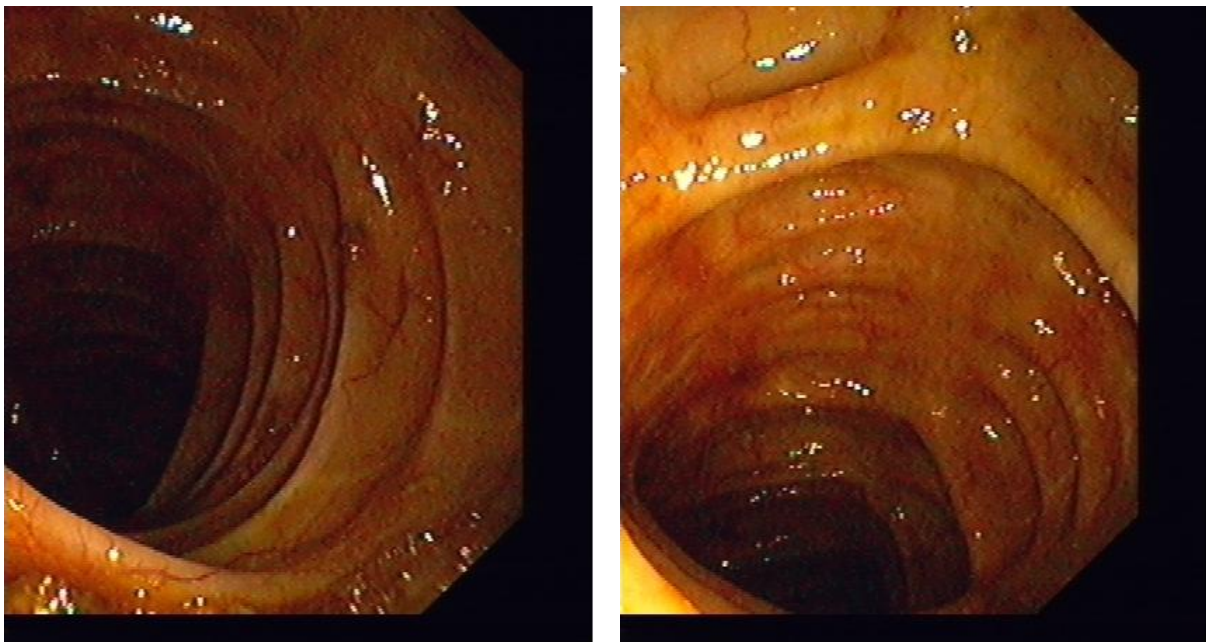


Fot. 2 Kontrolna kolonoskopia po leczeniu indukcyjnym adalimumabem – widoczny efekt gojenia się błony śluzowej z całkowitym zniknięciem owrzodzeń.

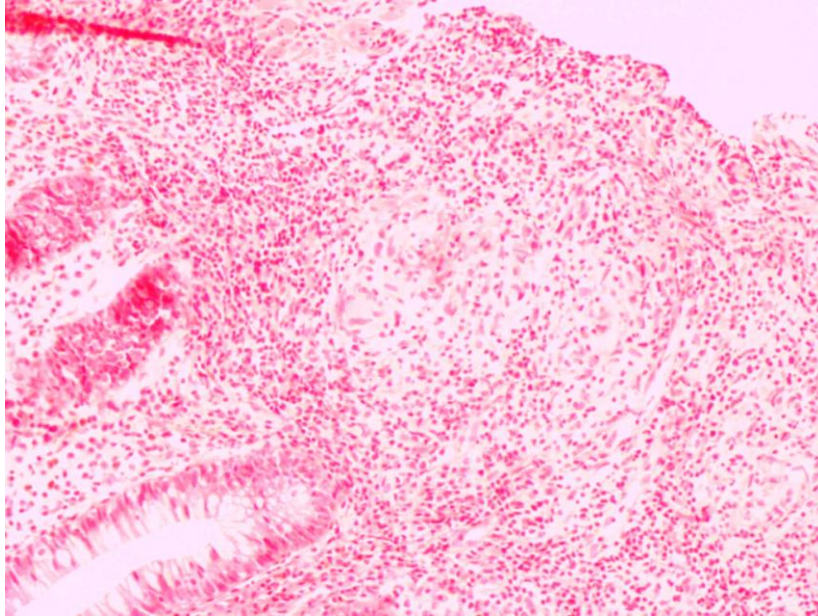




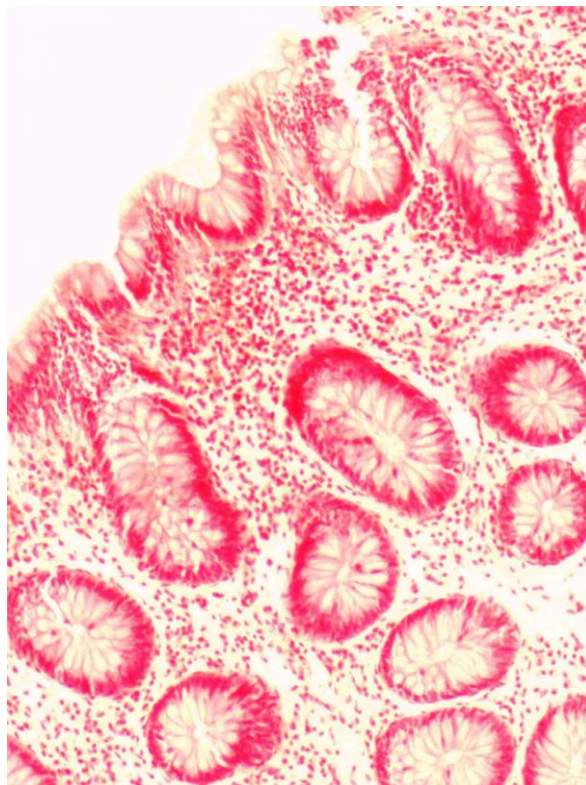
Fot.3 Aktywne zmiany zapalne w badaniu kolonoskopowym u pacjenta z ch.L-C – widoczne liczne linijne owrzodzenia, rozpulchnienie błony śluzowej, krwawliwość kontaktowa.



Fot. 4 Obraz jelita grubego w kontrolnej kolonoskopii po leczeniu indukcyjnym infliksymabem – widoczny efekt gojenia się błony śluzowej pod wpływem leczenia.

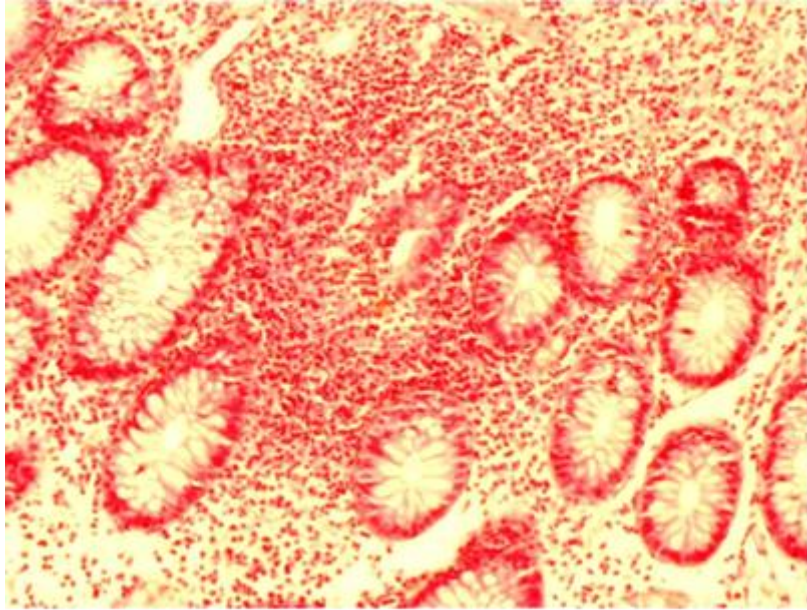


Fot. 5 Biopłat jelita grubego przed leczeniem - widoczny aktywny naciek zapalny o umiarkowanym nasileniu z centralnie zlokalizowanym ziarninakiem nieserowaciejącym (barwienie H+E, pow. 10x).

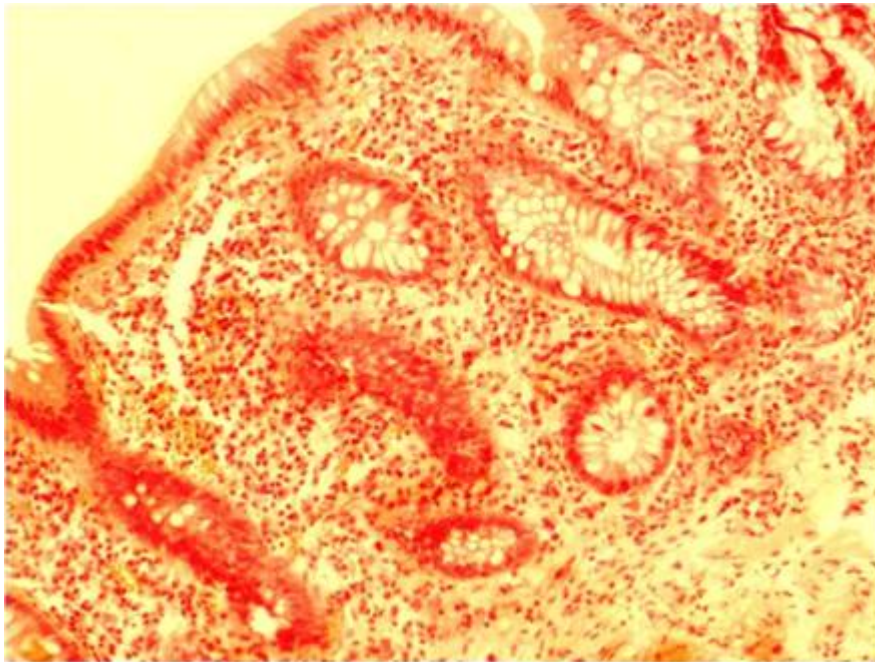


Fot. 6 Biopłat jelita grubego po leczeniu adalimumabem – zmniejszenie nasilenia nacieku zapalnego w obrębie błony śluzowej i zmiana jego charakteru z aktywnego na przewlekły (H+E, pow. 10x).

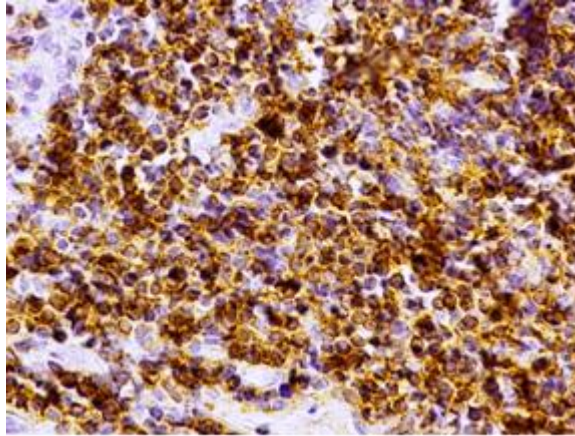




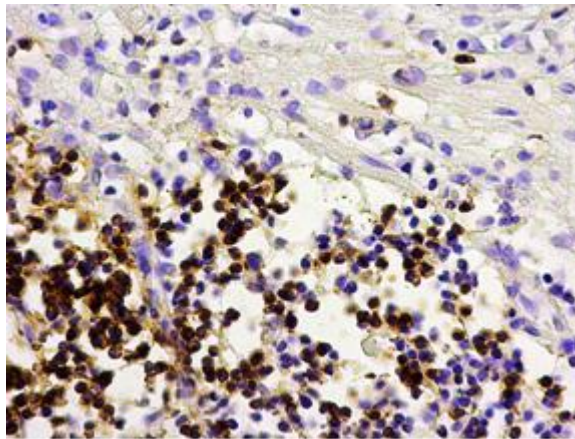
Fot. 7 Biopłat jelita grubego przed leczeniem – aktywny naciek zapalny o umiarkowanym nasileniu z zaburzeniem układu krypt jelitowych (H+E, pow 10x).



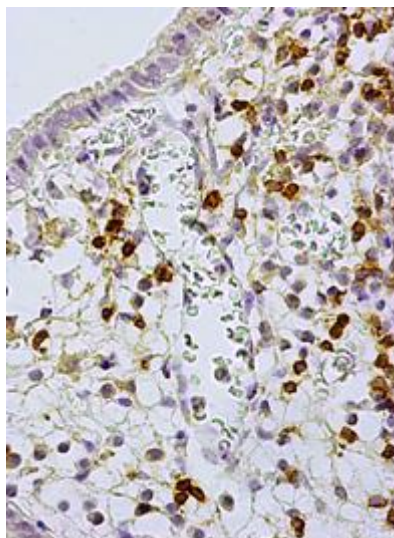
Fot. 8 Biopłat jelita grubego po leczeniu infliksymabem – widoczne zmniejszenie intensywności nacieku zapalnego (H+E, pow 10x).



Fot. 9 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD4 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

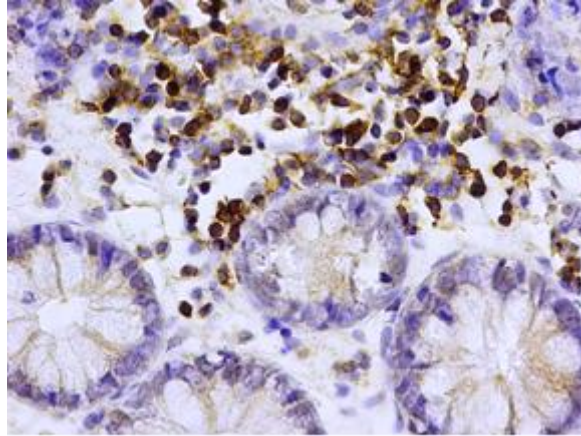


Fot. 10 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD4 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.

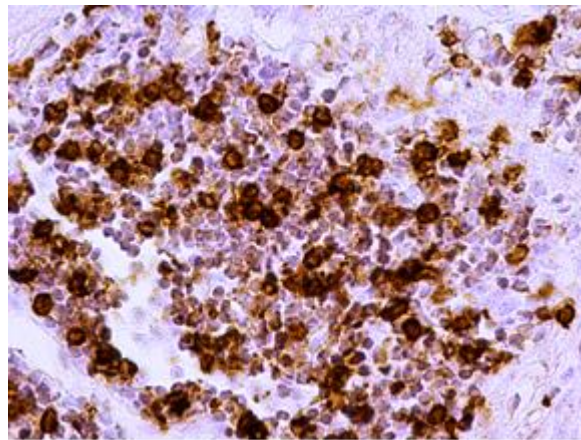


Fot. 11 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD4 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

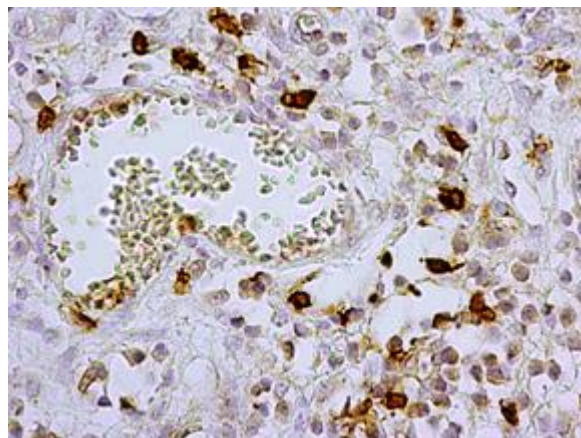




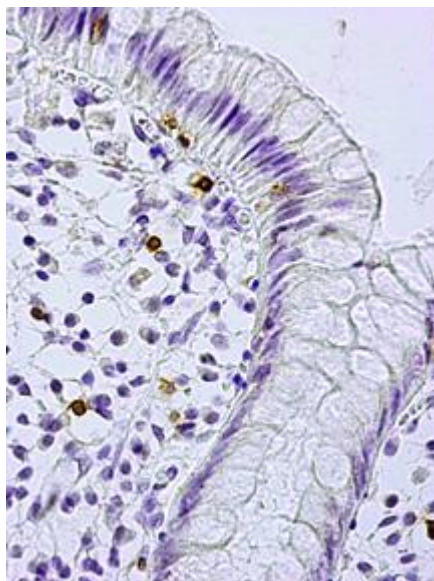
Fot. 12 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD4 w biopsacie jelia grubego pobranym z miejsca niezmiennego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.



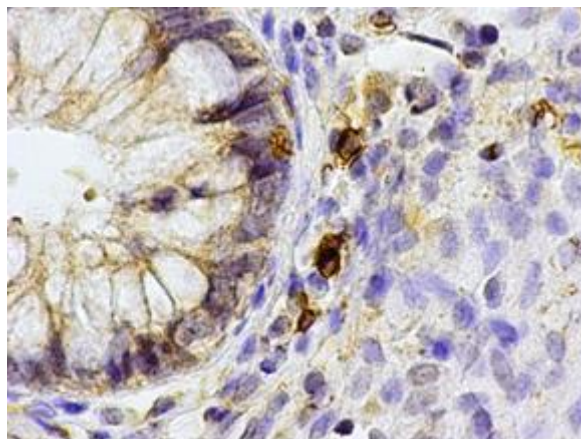
Fot. 13 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD8 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



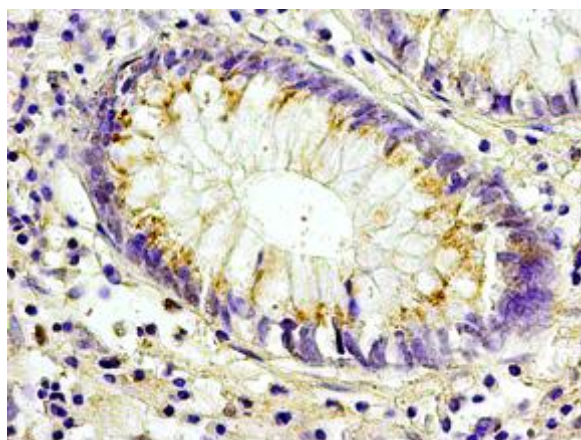
Fot. 14 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD8 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 15 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD8 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmiennego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

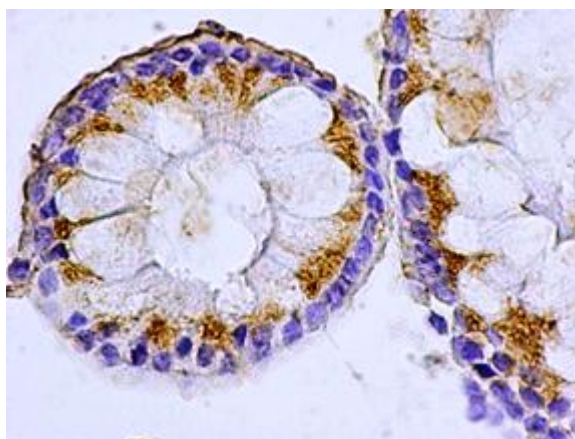


Fot. 16 Immunocytochemiczna lokalizacja cząsteczki CD8 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmiennego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.

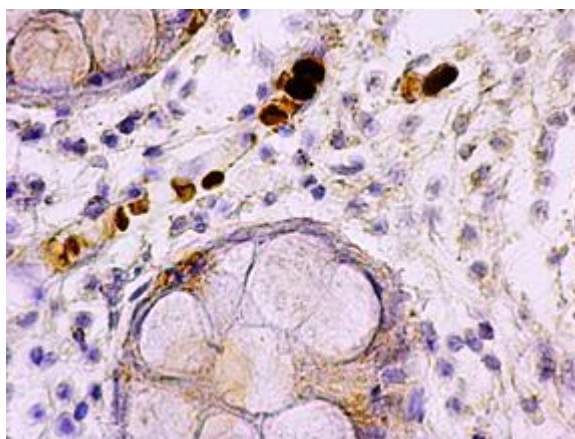


Fot. 17 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

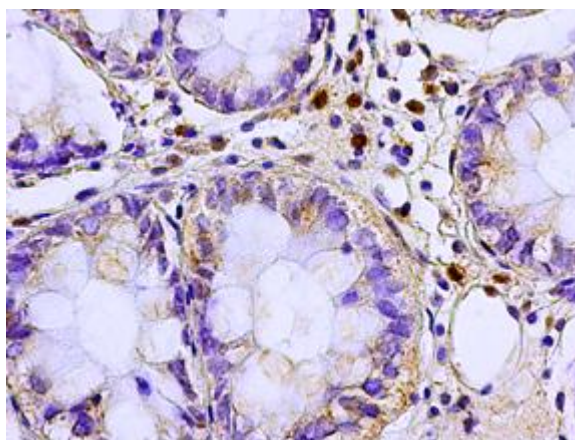




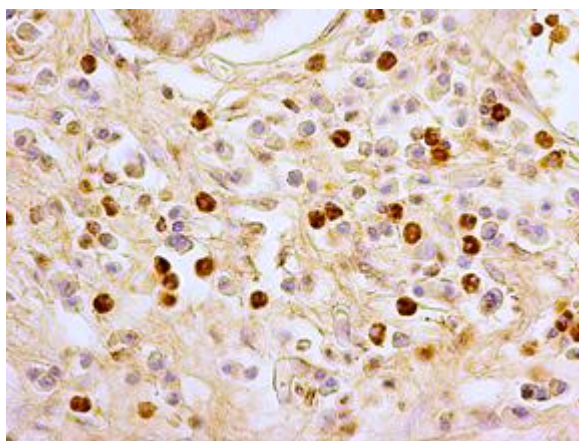
Fot. 18 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w komórkach nabłonka w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



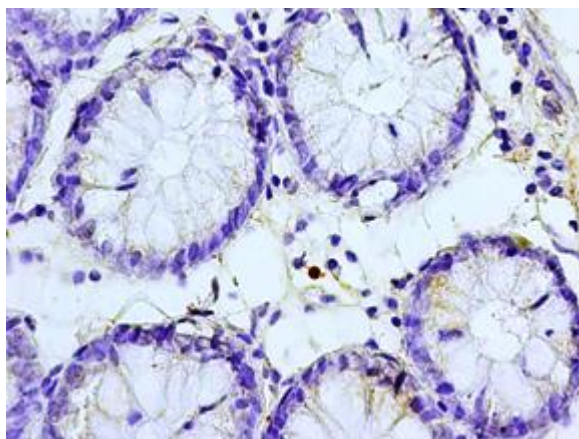
Fot. 19 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.



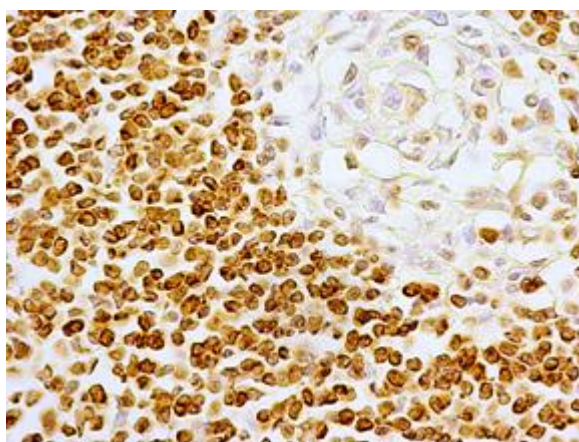
Fot. 20 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 21 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w komórkach blaszki właściwej w zmienionym zapalnie jelicie grubym po leczeniu (mat. operacyjny) u chorego, który odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.

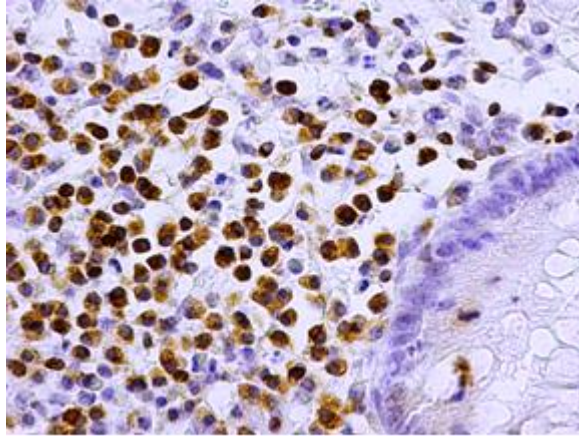


Fot. 22 Immunocytochemiczna lokalizacja aktywnej kaspazy 3 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmiennego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.

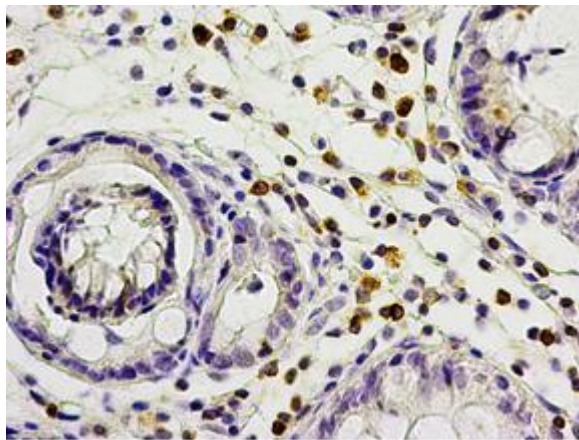


Fot. 23 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

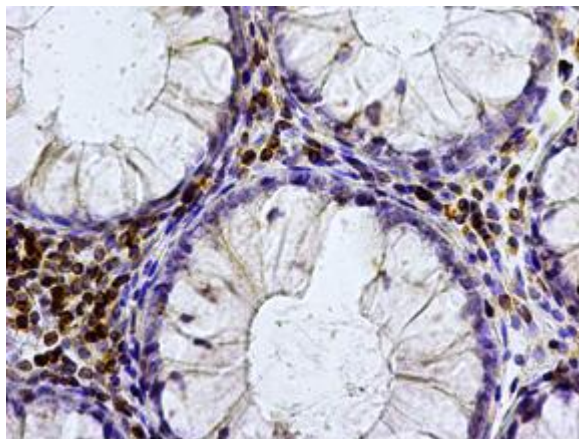




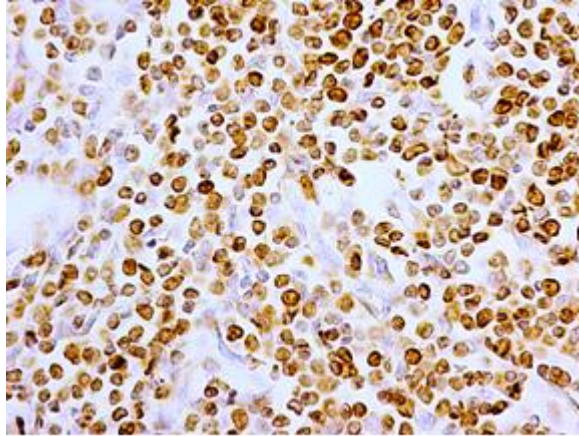
Fot. 24 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



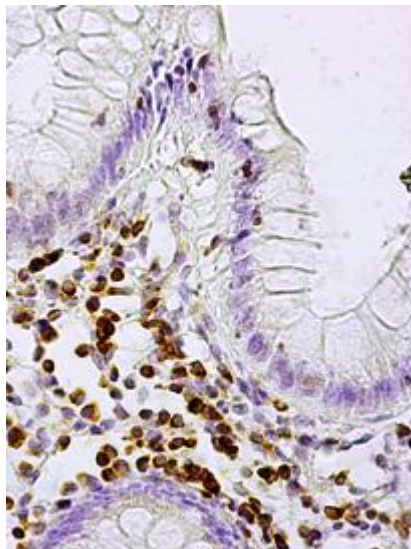
Fot. 25 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u pacjenta, który odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.



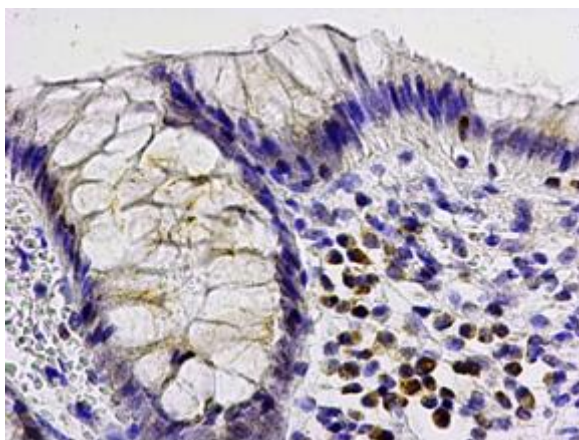
Fot. 26 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u pacjenta, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.



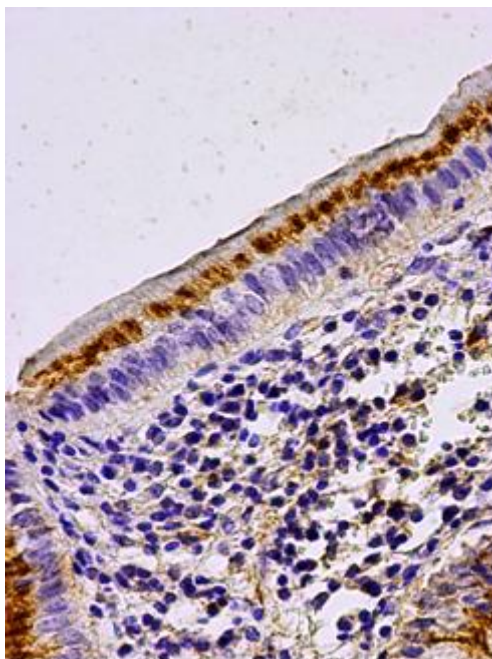
Fot. 27 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w zmienionym zapalnie jelicie grubym po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na terapię (mat. operacyjny). Technika ABC, obiektyw 40x.



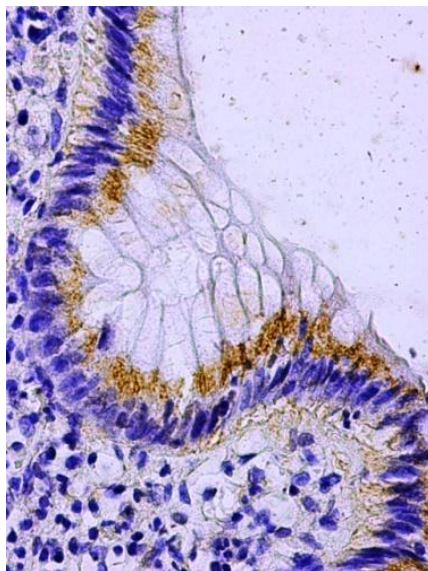
Fot. 28 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w bioptacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 29 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bcl-2 w bioptacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmienionego zapalnie po leczeniu. Technika ABC, obiektyw 40x.

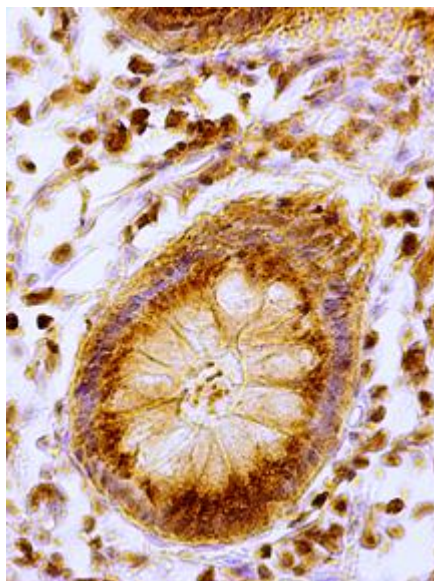


Fot. 30 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

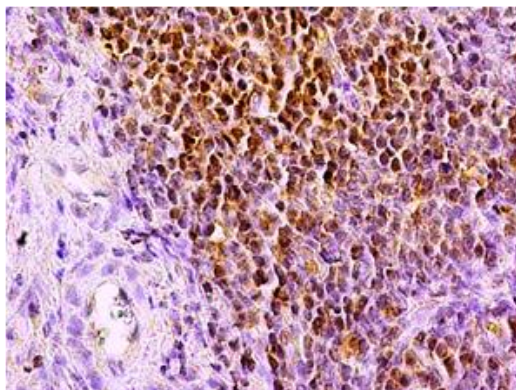


Fot. 31 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

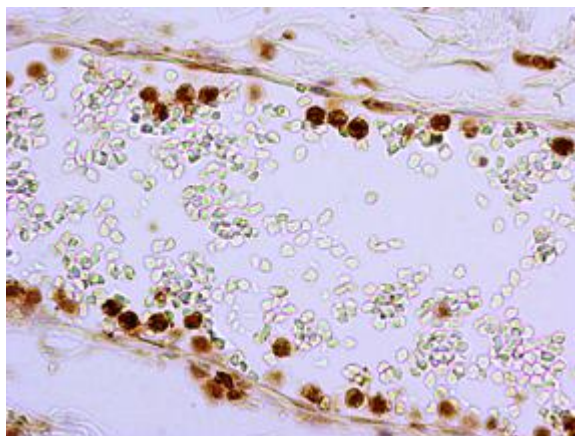




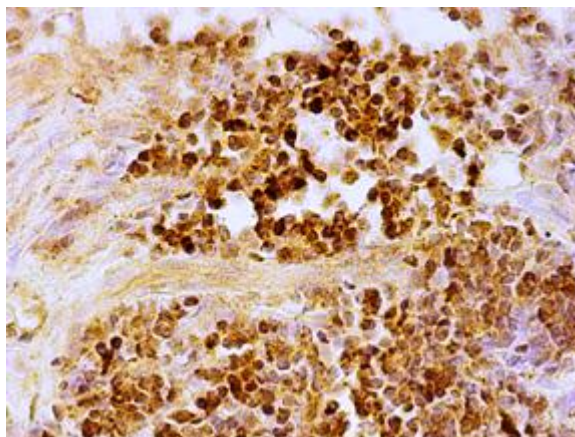
Fot. 32 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



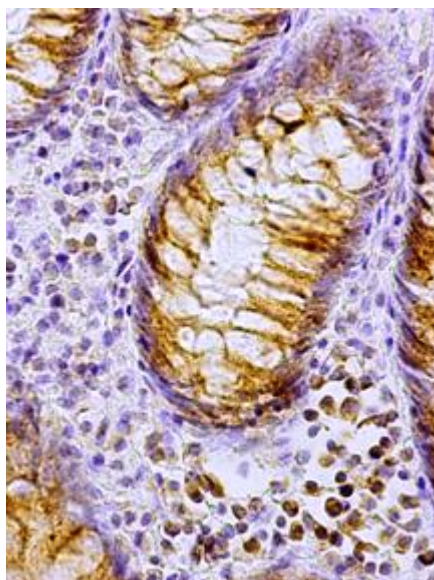
Fot. 33 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w zmienionym zapalnie jelicie grubym po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na leczenie (mat. operacyjny). Technika ABC, obiektyw 40x.



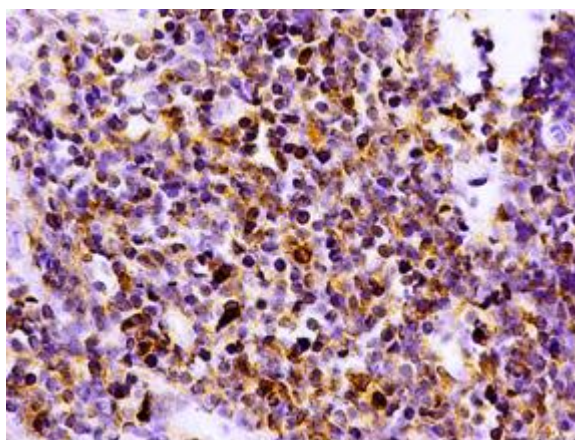
Fot. 34 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w zmienionym zapalnie jelicie grubym po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na leczenie (mat. operacyjny - naczynie krwionośne blaszki właściwej błony śluzowej). Technika ABC, obiektyw 60x.



Fot. 35 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w bioptacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie (blaszka właściwa błony śluzowej). Technika ABC, obiektyw 40x.

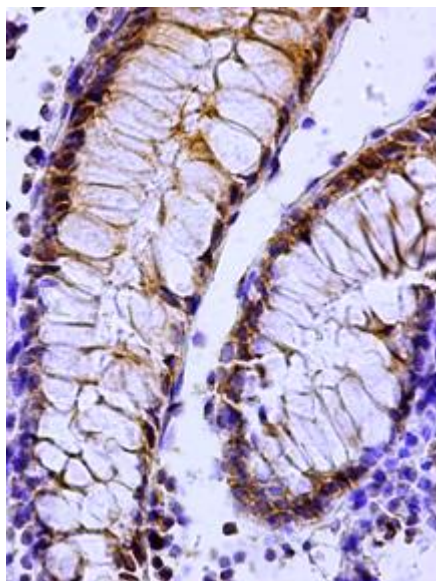


Fot. 36 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Bax w bioptacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

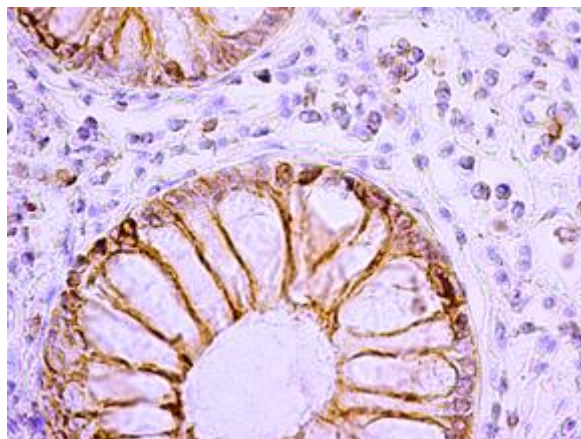


Fot. 37 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w bioptacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

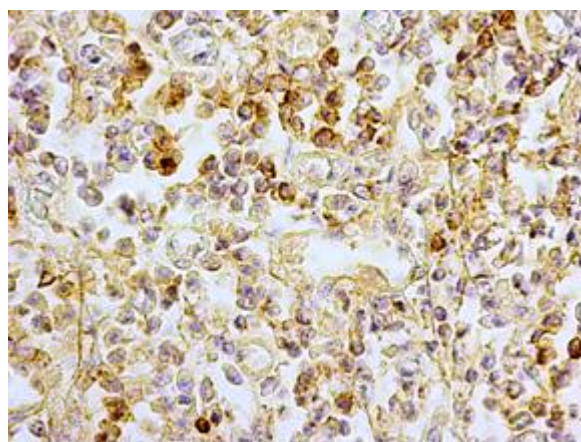




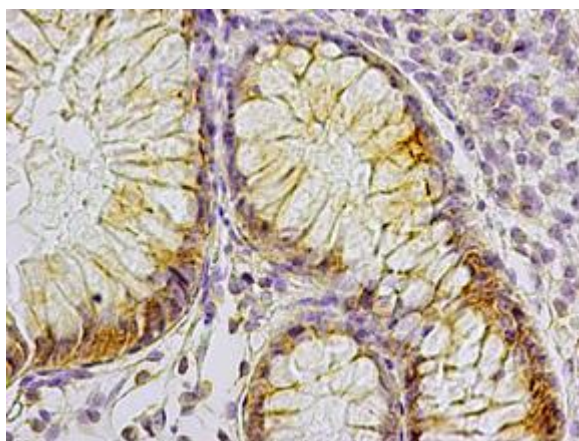
Fot. 38 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



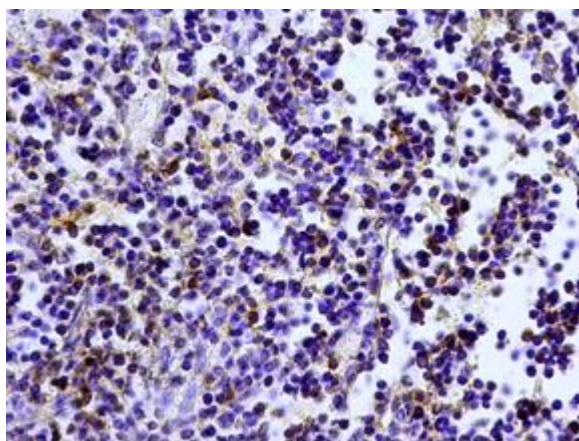
Fot. 39 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.



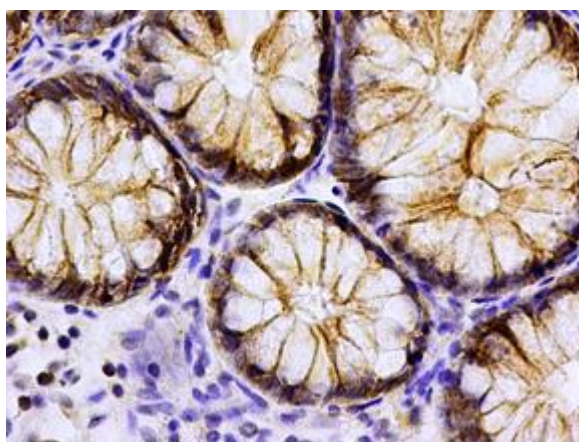
Fot. 40 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w blaszce właściwej zmienionej zapalnie błony śluzowej jelita grubego po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na leczenie (mat. operacyjny). Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 41 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.

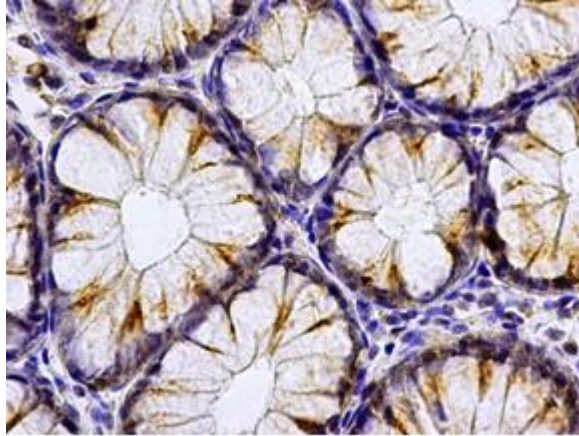


Fot. 42 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie (blaszka właściwa błony śluzowej). Technika ABC, obiektyw 40x.

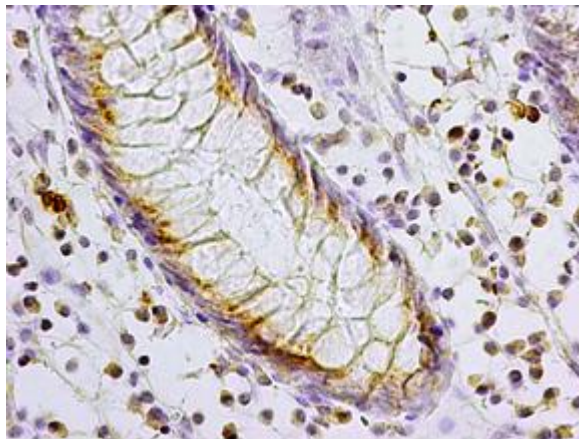


Fot. 43 Immunocytochemiczna lokalizacja białka Fas w biopsycie jelita grubego pobranym z miejsca niezmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na leczenie. Technika ABC, obiektyw 40x.

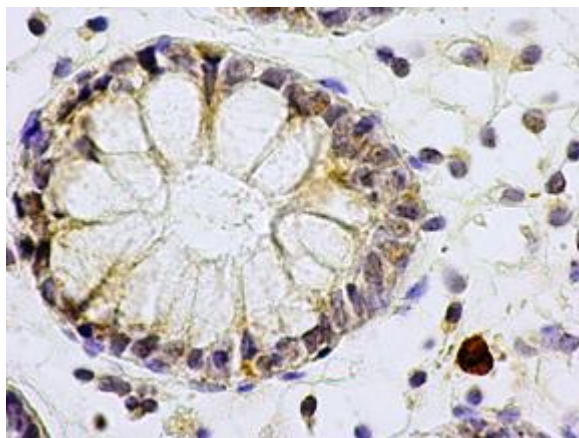




Fot. 44 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

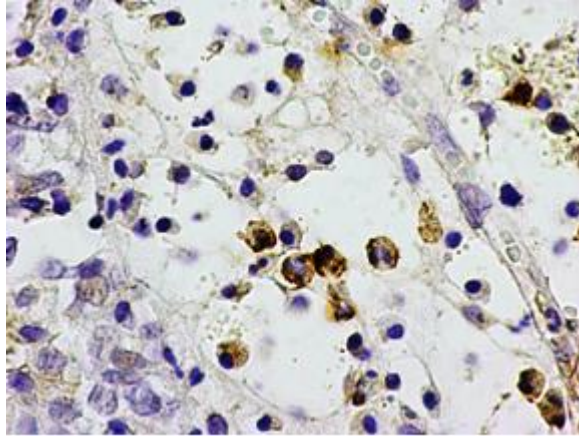


Fot. 45 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.

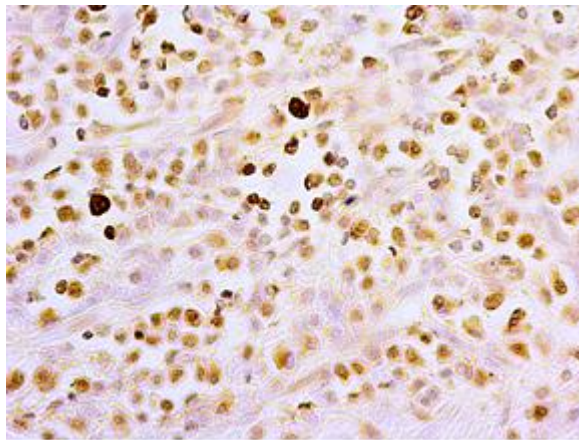


Fot. 46 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.

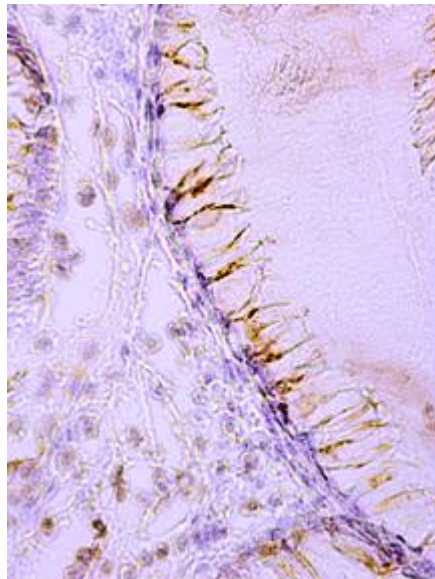




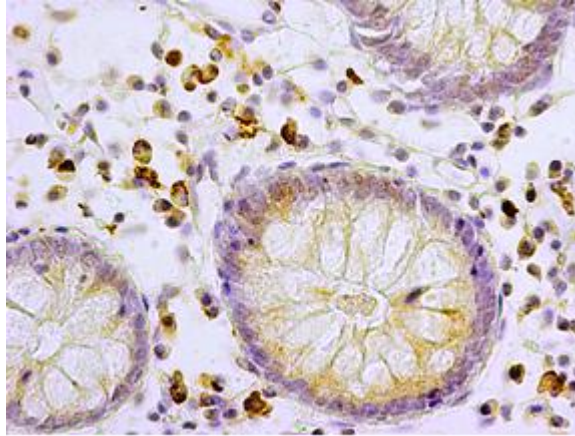
Fot. 47 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.



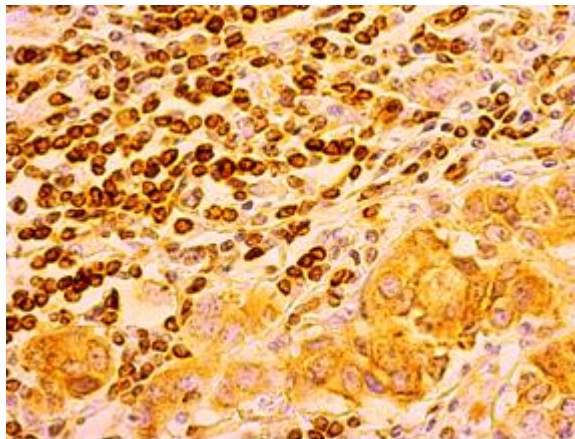
Fot. 48 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNF1 w blaszce właściwej zmienionej zapalnie błony śluzowej jelita grubego po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na leczenie (mat. operacyjny). Technika ABC, obiektyw 40x.



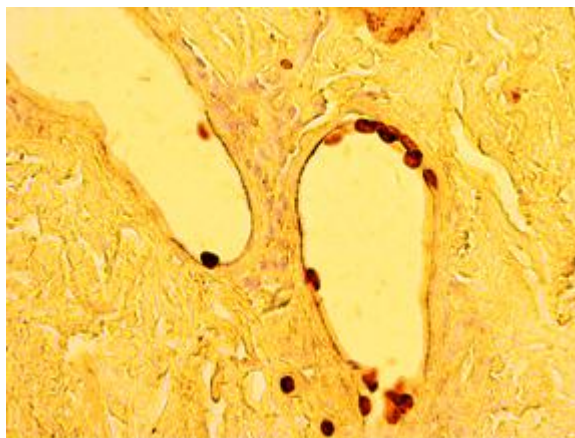
Fot. 49 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca zmienionego zapalnie po leczeniu u chorego, który nie odpowiedział na terapię. Technika ABC, obiektyw 40x.



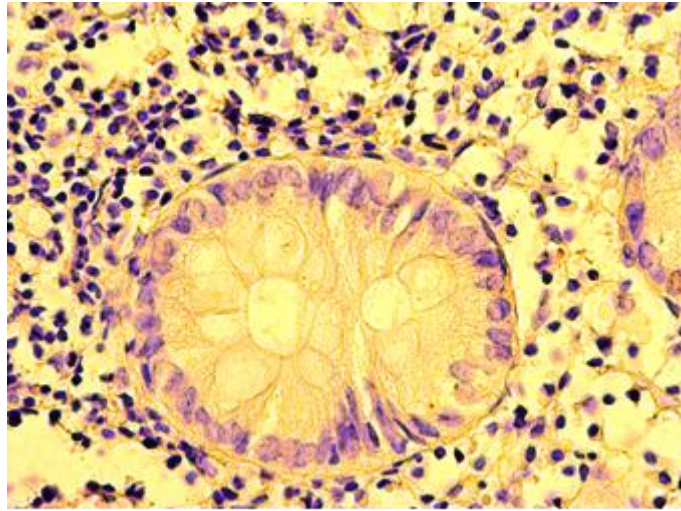
Fot. 50 Immunocytochemiczna lokalizacja białka TNFR1 w biopsacie jelita grubego pobranym z miejsca niezmiennego zapalnie przed leczeniem. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 51 Przykład kontroli pozytywnej stosowanych przeciwciał - ekspresja białka Bcl-2 w tkance raka gruczołowego piersi. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 52 Przykład kontroli pozytywnej stosowanych przeciwciał - ekspresja aktywnej kaspazy 3 w tkance raka płaskonabłonkowego skóry. Technika ABC, obiektyw 40x.



Fot. 53 Biotat jelita grubego - przykład kontroli negatywnej (zastąpienie specyficznego przeciwciała przez surowicę odpowiedniego gatunku w roztworze Dako Antibody Diluent).