

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki

Ewelina Swora

**Ocena subpopulacji limfocytów T-regulatorowych, cytokin Th1/Th2, stanu
odżywienia u pacjentów z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Prof. dr hab. med. Marian Grzymisławski

Poznań 2012

Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności mojemu opiekunowi naukowemu

prof. dr hab. Marianowi Grzymisławskiemu

za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy doktorskiej,
cenne rady i dyskusje, które w sposób znaczący przyczyniły się
do jej powstania, a także za cierpliwość, życzliwość i wsparcie
w trakcie realizacji i redagowania pracy.

Składam serdeczne podziękowania:

prof. dr hab. Krzysztofowi Wiktorowiczowi

dr Jackowi Karczewskiemu

za życzliwość, okazaną pomoc i cenne uwagi
w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej,
za pomoc w wykonaniu dodatkowych badań,
niezbędnych do zrealizowania celów pracy doktorskiej.

Niniejszą pracę dedykuję moim rodzicom,

w podziękowaniu za pomoc, troskę i wyrozumiałość
oraz wszelkie słowa otuchy w czasie jej pisania.

Spis treści

1. Wstęp	8
1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit.....	8
1.1.1. Definicja.....	8
1.1.2. Epidemiologia	9
1.1.3. Patogeneza	11
1.1.3.1. Wpływ środowiska	11
1.1.3.2. Czynniki immunologiczne	19
1.1.3.3. Czynniki genetyczne	24
1.1.4. Objawy i przebieg NCHZJ	26
1.1.4.1. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego.....	26
1.1.4.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna.....	28
1.1.5. Diagnostyka NCHZJ	29
1.1.5.1. Badanie przedmiotowe.....	29
1.1.5.2. Badania laboratoryjne i serologiczne	29
1.1.5.3. Badania endoskopowe z weryfikacją histopatologiczną	29
1.1.5.4. Badania obrazowe	30
1.1.5.5. Diagnostyka różnicowa.....	31
1.1.6. Objawy pozajelitowe i powikłania NCHZJ	33
1.1.7. Klasyfikacja NCHZJ	38
1.1.7.1. Klasyfikacja montrealaska i wskaźnik aktywności – CDAI choroby Leśniowskiego-Crohna	38
1.1.7.2. Klasyfikacja i wskaźniki aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	39
1.1.8. Leczenie NCHZJ	42
1.1.8.1. Leczenie farmakologiczne NCHZJ	42
1.1.8.2. Leczenie biologiczne w przebiegu NCHZJ	46
1.1.8.3. Rola leczenia chirurgicznego w NCHZJ	52
2. Cel i założenia pracy	54
3. Materiał i metody	55
3.1. Charakterystyka grupy badanej	55

3.2. Metoda cytometrii przepływowej	56
3.3. Analiza statystyczna	60
4. Wyniki	61
5. Dyskusja	80
6. Wnioski.....	88
7. Streszczenie	89
8. Summary	91
9. Spis tabel	92
10. Spis rycin.....	93
11. Piśmiennictwo.....	95

Wykaz użytych skrótów

AIEC	adherent-invasive Escherichia coli
AOPP	Advanced Oxidation Protein Products, zaawansowane produkty utleniania białek
5ASA	5-aminosalicylic acid, kwas 5-aminosalicylowy
AZA	azatiopryna
BALT	bronchial-associated lymphoid tissue, tkanka limfatyczna dróg oddechowych
BCM	body mass cell, masa komórek ciała
BMI	body mass index, wskaźnik masy ciała
CAI	Colitis Activity Index, kliniczny wskaźnik aktywności choroby - wrzodziejącego zapalenia jelita grubego
CARD 15	caspase recruitment domain, domena rekrutująca kaspazę
CDAI	Crohn Disease Activity Index, wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna
ChLC (CD)	choroba Leśniowskiego - Crohna (Crohn Disease)
CRP	C-Reactive Protein, białko C-reaktywne
DALM	dysplasia associated lesions or masses, ogniska dysplazji w błonie śluzowej
ECCO	European Crohn's and Colitis Organization, Europejska Organizacja Choroby Crohna i Colitis Ulcerosa
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, test immunoenzymatyczny
FC	flow cytometry, cytometria przepływowa
GALT	gut-associated lymphoid tissue, tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
IBD	Inflammatory Bowel Disease, zapalne choroby jelit
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1, cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IFNγ	interferon gamma
Ig	immunoglobulina
IL-1	interleukin – 1, interleukina – 1
IL-2	interleukin – 2, interleukina – 2
IL-3	interleukin – 3, interleukina – 3

IL-4	interleukin – 4, interleukina – 4
IL-6	interleukin – 6, interleukina – 6
IL-8	interleukin – 8, interleukina – 8
IL-10	interleukin – 10, interleukina – 10
IL-12	interleukin – 12, interleukina – 12
IL-17	interleukin – 17, interleukina – 17
IL-23	interleukin – 23, interleukina – 23
ImpSS	„impulsive sensation seeking”, osobowość typu: „impulsywny, poszukujący doznań”
MAP	miogen-activated protein kinase, kinaza białkowa
MHC	major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej
6MP	6-merkaptopuryna
MR	magnetic resonance imaging, rezonans magnetyczny
MTX	metotrexat
NCHZJ	nieswoiste choroby zapalne jelit (ang. Inflammatory Bowel Disease, IBD)
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2, białko odgrywające istotną rolę w systemie odporności, kodowane przez gen umieszczony na chromosomie 16
NKG2D	C-type lectin-like type receptor and belongs to the NK group 2, receptor stymulujący komórki NK
NRAMP1	natural resistance-associated macrophage protein1, białko naturalnej odpowiedzi związanej z makrofagami 1
OB	odczyn Biernackiego
pANCA	perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies – okołojądrowe przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów
pASCA	anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, przeciwciała przeciwko drożdżom Saccharomyces cerevisiae
PMN-e	elastaza granulocytów wielojądrzastych
PSC	primary sclerosing cholangitis, pierwotnie stwardniające zapalenie dróg żółciowych
SCFA	short chain fatty acid, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
Th	T helper cell, limfocyty T pomocnicze odpowiedzialne za pobudzenie odpowiedzi odpornościowej

TK	computer tomography, tomografia komputerowa
TNFα	tumor necrosis factor α , czynnik martwicy nowotworów α
Treg	regulatory T cells, limfocyty T regulatorowe
WZJG (UC)	ulcerative colitis, wrzodziejące zapalenie jelita grubego (colitis ulcerosa)

1. Wstęp

1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit

1.1.1. Definicja

Choroby określane mianem nieswoistych chorób zapalnych jelit (NCHZJ) obejmują wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa*), chorobę Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's disease*) i nieokreślone zapalenie okrężnicy (*indeterminate colitis*). Ze względu na brak cech patognomicznych i specyficznych testów diagnostycznych, ich rozpoznanie ustala się poprzez wykluczenie pozostałych jednostek. Wspólną cechą tych chorób jest ich nieznaną pierwotną przyczyną i złożona wieloczynnikowa patogeneza [60].

Pierwsze polskie doniesienie o chorobie Leśniowskiego-Crohna (CD) pojawiło się w roku 1903, prof. Antoni Leśniowski, ówczesny kierownik II Kliniki Chirurgii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego, opublikował w czasopiśmie „Medycyna” opis przypadku 30-letniej pacjentki z guzem w części wstępującej okrężnicy, u której wykonano częściową resekcję jelita [16]. Dziesięć lat później, Szkot T. Kennedy Dalziel opisał przebieg ChLC u 13 pacjentów, uznając jako ich ewentualną przyczynę prątki paratuberculosis (MAP- *Mycobacterium avium paratuberculosis*). Dopiero doniesienie Burrilla Crohn'a, Leona Ginzburg'a i Gordona Oppenheimera z roku 1932 na łamach „Journal of American Medical Association” zostało uznane za pierwszy oficjalny opis choroby [92,97,186]. Autorzy stworzyli klasyfikację uwzględniającą przebieg kliniczny i dominujące objawy schorzenia.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC) zostało po raz pierwszy opisane w 1859 roku przez Samuela Wilksa, lekarza z Guy's Hospital w Londynie, który zróznicował ją z owrzodzeniami jelita grubego wywołanymi czynnikami zakaźnymi i zatruciem rtęcią oraz nazwał idiopatycznym zapaleniem jelita grubego [11]. W 1875 roku Wilks i Moxon przedstawili dokładne aspekty anatomiczno-kliniczne i zaproponowali nazewnictwo – *colitis ulcerosa*. W 1895 roku Hale-White sklasyfikował wrzodziejące zapalenie jelita grubego jako osobną jednostkę chorobową. Do 1909 roku opisano około 300 przypadków idiopatycznego zapalenia jelita grubego i scharakteryzowano przebieg kliniczny tej choroby. Obraz rektoskopowy błony śluzowej odbytnicy w idiopatycznym zapaleniu jelita grubego po raz pierwszy opisał w 1921 roku Arthur Hurst. Zaobserwował on podobieństwo obrazów rektoskopowych idiopatycznego

i czerwonego zapalenia jelita grubego oraz podkreślił konieczność diagnostyki różnicowej tych chorób [186].

Na początku XX wieku obie jednostki chorobowe zostały uznane jako choroby o podłożu psychosomatycznym. Opierając się na tej teorii podjęto próby terapii mającej na celu kontrolę stresu i psychoanalizy. Teoria ta jednak została odrzucona ze względu na fakt, że nie została zidentyfikowana predyspozycja czy też cechy charakteru, typ osobowości, stwierdzono natomiast, że zaburzenia emocjonalne czy zmiany profilu psychologicznego są raczej konsekwencją, a nie przyczyną choroby [97]. W obecnych czasach często powraca się do tego zagadnienia. I tak, Agostini A i wsp. dokonali oceny zmian czynnościowych mózgu w rezonansie magnetycznym u osób z WZJG w okresie remisji choroby i porównali wyniki z grupą kontrolną. Badacze stwierdzili zmiany funkcjonalne ciała migdałowatego u chorych z WZJG, które mogły być zarówno skutkiem choroby, jak i czynnikiem wpływającym na przebieg choroby. U chorych z WZJG zaobserwowano również zaburzenia emocjonalne charakteryzujące się zmniejszoną wrażliwością na pozytywne treści [1].

1.1.2. Epidemiologia

W chwili obecnej obserwuje się wyraźny wzrost zachorowań w regionach, w których ChLC (CD) wcześniej występowała rzadko, podczas gdy w regionach charakteryzujących się wysoką zapadalnością utrzymuje się na stałym poziomie, bądź wykazuje niewielką tendencję wzrostową. Obecnie współczynnik zapadalności na ChLC (CD) w Stanach Zjednoczonych wynosi 3,1-14,6 przypadków/100tys. mieszkańców/rok, a współczynnik chorobowości 26-199/100tys. mieszkańców/rok. W ostatnich kilkudziesięciu latach największą zachorowalność notuje się w krajach skandynawskich, Wielkiej Brytanii i Ameryce Północnej. Niższe wartości wyżej wymienionych współczynników obserwuje się w Europie Środkowej, najmniejsze zaś w Azji i Afryce [18]. Od sierpnia 2005 roku w Polsce jest prowadzony Krajowy Rejestr Choroby Leśniowskiego–Crohna, który gromadzi najważniejsze dane demograficzne i kliniczne. W Rejestrze uczestniczy 78 ośrodków z całego kraju, a liczba zarejestrowanych pacjentów wynosi ponad 2,5tys. Wciąż brakuje dokładnych danych dotyczących sytuacji epidemiologicznej w Polsce, ale szacuje się, że obecnie na ChLC choruje około 5tys. osób. Zapadają na nią ludzie między 16-40 rokiem życia, z wyższym lub średnim wykształceniem, zamieszkujący tereny zurbanizowane.

Częstość występowania jest porównywalna u obu płci. Najczęstszą lokalizacją zmian chorobowych jest końcowy odcinek jelita krętego i jelito grube [157].

Epidemiologia i etiologia WZJG (UC) i ChLC (CD) mają wiele cech wspólnych. Najczęściej występują u osób rasy białej, zaś wśród Żydów ashkenezyjskich zapadalność jest 3 do 6 razy większa niż w populacji ogólnej [129,131,186]. Chorobowość i zapadalność na WZJG i ChLC różni się nieznacznie, z przewagą dla WZJG. Z analizy populacji Europy i Stanów Zjednoczonych wynika, że zapadalność na WZJG wynosi około 6 do 8 przypadków/100 tys. mieszkańców, zaś szacunkowa chorobowość od 70 do 150/100 tys. mieszkańców. Wiele źródeł podaje, że zapadalność na ChLC (CD) rośnie 5 razy szybciej niż na WZJG (UC). W dostępnych wynikach badań jest niewiele informacji dotyczących wpływu etniczności na cechy kliniczne NCHZJ. Jednak w doniesieniu autorstwa Mangat BK i wsp. z 2011 roku zostały zebrane wiadomości dotyczące płci, wieku, pochodzenia etnicznego, typu NCHZJ, rozległości choroby oraz powikłań u pacjentów Vancouver General Hospital i wykazano, że roczne tempo przyrostu NCHZJ uzasadniające hospitalizację wynosiło u osób rasy kaukaskiej 12,9 na 100 000 osób (7,9 na 100 000 z CD, 5 na 100 000 z UC) w przeciwieństwie do południowej Azji gdzie wartości te wynosiły odpowiednio 7,7 na 100 000 osób (1 na 100 000 z CD, 6,8 na 100 000 z UC), Azji i Pacyfiku 2,1 na 100 000 osób (1,3 na 100 000 osób na CD, 0,8 na 100 000 osób dla UC), przy czym stosunek mężczyzn do kobiet był wyższy u osób z Azji Południowej i Azji i Pacyfiku niż u rasy kaukaskiej. Zarówno zakres choroby jak i powikłania znacznie różniły się w poszczególnych badanych grupach. Te wnioski sugerują istnienie różnic etnicznych w przebiegu choroby, pokazują jak ważną rolę w przebiegu i ekspresji choroby mają zmiany środowiska i migracje ludności [119]. Częstość występowania WZJG jest największa w krajach Europy Północnej, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, Kanadzie i Australii. Chorobowość w tych krajach wśród osób rasy białej wynosi 80-120 przypadków/100 tys. mieszkańców, natomiast zapadalność 7-15 nowych zachorowań na WZJG/100 tys. mieszkańców/rok. Najrzadziej choroba występuje w Ameryce Południowej, Azji i Japonii. Szacuje się, że chorobowość i zapadalność w tych rejonach są około 10-krotnie niższe niż w Europie i Ameryce Północnej. W Polsce nie ma precyzyjnych danych na temat epidemiologii WZJG [103,113,186].

Zachorowanie na WZJG może wystąpić w każdym wieku, jednak szczyt zapadalności przypada na okres między 20 a 40 rokiem życia oraz powyżej 65 roku życia. Nie

stwierdzono różnic w zapadalności u kobiet i mężczyzn [20,95,183,186]. U osób, które nie palą lub zaprzestały palenia tytoniu oraz u osób po appendektomii istnieje większe ryzyko zachorowania na WZJG (UC) [43]. W metaanalizie dziewięciu badań opublikowanej w 2010 roku, które oparte były na danych populacyjnych wykazano, że łączny standaryzowany wskaźnik umieralności w NCHZJ (IBD) wynosił 1,37 (95% CI:1,30-1,49) [18,52].

1.1.3. Patogeneza

W chwili obecnej uważa się, że przewlekłe zapalenie błony śluzowej jelita w NCHZJ (IBD) jest głównie konsekwencją odpowiedzi immunologicznej na antygeny własnej mikroflory jelitowej. Jako przyczynę podaje się wpływ zmian we florze bakteryjnej jelit, czynników immunologicznych, które powodują zaburzenia układu immunologicznego błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz uwarunkowań genetycznych [50,161,166]. Zjawiskami, których rolę podkreśla się również w patogenezie NCHZJ (IBD) są: zjawisko angiogenezy (proces tworzenia naczyń krwionośnych) i antyangiogenezy. W wycinkach tkankowych pobranych od chorych wykazano zaburzenia mikrounaczynienia błony śluzowej jelit, zwłaszcza w miejscach gdzie toczył się aktywny proces zapalny. W ostatnim czasie w patomechanizmie zmian w NCHZJ (IBD) podkreśla się też rolę komórek tucznych (mastocytów). Zaobserwowano zwiększoną ich ilość w błonie śluzowej jelit oraz zwiększenie stężenia wydzielanych przez nie substancji (histamina, tryptaza, IL16, substancja P, heparyna) osób chorych w porównaniu z osobami zdrowymi. Pośród wszystkich wymienionych zaburzeń biorących udział w patogenezie należy pamiętać także o procesie fibroogenezy (włóknienia), który jest jednak wtórnym mechanizmem względem przewlekłego procesu zapalnego w ścianie jelit [18].

1.1.3.1. Wpływ środowiska

Wśród czynników środowiskowych wymienia się przede wszystkim bakterie flory jelitowej. Poznaniem składu mikroflory jelitowej i jej metabolizmu zajmuje się wielu badaczy na świecie. Coraz powszechniejsze staje się przekonanie, że bakterie występujące w świetle jelita mają udział w etiopatogenezie chorób zapalnych oraz nowotworowych przewodu pokarmowego.

W badaniach eksperymentalnych na zwierzęcych modelach NCHZJ udowodniono, że fizjologiczna flora bakteryjna jelit jest niezbędna do powstania zmian zapalnych

w przewodzie pokarmowym. U myszy transgenicznych pozbawionych genów dla interleukin (IL-2, IL-10), zmiany zapalne w błonie śluzowej jelita wykształcają się w obecności bakterii i ustępują, gdy przewód pokarmowy zwierząt zostaje poddany dekontaminacji [50,161,166].

U chorych na NCHZJ zaobserwowano różnice ilościowe i jakościowe w mikroflorze bakteryjnej w porównaniu z osobami zdrowymi. Typowa jest przewaga agresywnych (szkodliwych) drobnoustrojów *Bacteroides spp.*, *Escherichia coli* i *Enterobacterium spp.* Zdecydowanie mniej jest *Bifidobacterium* i *Lactobacillus spp.* [165,180,182]. Istnieją przesłanki, że mikroflora jelitowa może odgrywać istotną rolę w inicjowaniu i/lub podtrzymywaniu stanu zapalnego [63,162,182].

Upośledzona reakcja ostrej fazy procesu zapalnego zmniejsza usuwanie zabitych bakterii *Escherichia coli* otorbionych w obrębie skóry. Poza tym makrofagi pacjentów chorujących na ChLC uwalniają mniej cytokin prozapalnych po stymulacji receptora Toll-podobnego (ang. Toll-like-receptor) [65].

Za udziałem bakteryjnej flory jelitowej w patogenezie NCHZJ (IBD) przemawiają także obserwacje kliniczne: zabiegi czyszczące jelito i antybiotykoterapia, redukujące tę florę, prowadzą do poprawy klinicznej. Resekcja zastawki krętniczno-kątniczej i pooperacyjna kolonizacja bakteryjna pozostawionego odcinka jelita krętego wiążą się z nawrotem choroby. Ileostomia zaś i zmiana kierunku pasażu kałowego przynosi poprawę [156]. Nie bez powodu w literaturze znaleźć można również paradygmat „bez bakterii, nie ma zapalenia jelita”, który został stworzony celem podkreślenia kluczowej roli mikroflory jelitowej w patogenezie NCHZJ (IBD) [40]. Bakterie odgrywają ważną rolę zarówno w patogenezie jak i powstawaniu objawów klinicznych czy powikłań NCHZJ (IBD). Antybiotyki mogą zmniejszyć inwazję tkankową i wyeliminować agresywne gatunki bakterii. Są one stosowane w leczeniu powikłań zapalenia, oraz celem zmiany flory bakteryjnej, która może powodować konkretne efekty przeciwzapalne. Ponadto zahamowanie metabolizmu bakterii i bezpośredni wpływ antybiotyków na strukturę i funkcję jelit może powodować symptomy, których nie można odróżnić od objawów spowodowanych przez proces zapalny. Mimo, że obecne badania kliniczne nie spełniają kryteriów leczenia opartych na dowodach, sugeruje się, że metronidazol a w mniejszym stopniu cyprofloksacyna są skuteczne w leczeniu ChLC, przetokach okołodbytnicznych [72]. W tabeli 1 i 2 przedstawiono rolę bakterii w przewlekłym NCHZJ (IBD).

Tabela 1 Rola bakterii w przewlekłym nieswoistym zapaleniu jelit [162,182]

	Choroba Leśniowskiego- Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Pouchitis (zapalenie zbiornika krętnicz- odbytowego)
Występowanie choroby w miejscach największego nagromadzenia bakterii	Końcowy odcinek jelita cienkiego (ileum terminale), okrężnica (colon)	okrężnica (colon)	Pouch w krętnicy, Ileal pouch
↑ Adherencja śluzówkowa	+	+	Nie badano
↑ Inwazja przez śluzówkę	+	+	Nie badano
↓ Stan zapalny w przypadku zastosowania bypassu lub oszczędzania jelit	+	-	+
Odpowiedź na antybiotykoterapię	Tylko colon	-	+
Działanie ochronne probiotyków	Nie badano	+	+
Nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna na bakterie	+	+	Nie badano
Zaostrzenie przez patogeny	+	+	Nie badano

Choroby zapalne jelit wiążą się ze zmianami zarówno jakościowymi jak i ilościowymi dotyczącymi mikroflory. Funkcjonalne znaczenie tych zmian oraz ich rola w patogenezie a NCHZJ (IBD) pozostaje jeszcze do wyjaśnienia. Szacuje się, że mikroflora jelitowa obejmuje 40 tysięcy lub więcej różnych gatunków bakterii. Drobnoustroje zajmują 50% objętości kału [42]. W tabeli 2 przedstawiono wybrane czynniki infekcyjne mające wpływ na toczący się w jelitach przewlekły proces zapalny w NCHZJ (IBD).

Tabela 2 Czynniki infekcyjne w patogenezie IBD: dowody za i przeciw [109]

Patogen	dowody popierające	dowody zaprzeczające
Mycobacterium paratuberculosis	<ul style="list-style-type: none"> - wyniki histopatologiczne podobne do ChLC - wyższe poziomy przeciwciał anty-MAP u pacjentów z ChLC - skuteczność kliniczna MTX i 6MP w IBD oraz skuteczność <i>in vitro</i> przeciwko MAP - podobieństwo pomiędzy MAP i białkiem NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein1) 	<ul style="list-style-type: none"> - nie potwierdzono w badaniach epidemiologicznych
Escherichia coli	<ul style="list-style-type: none"> - kolonizacja końcowego odcinka krętnicy w ChLC - wysokie miana przeciwciał i DNA w ChLC - powiązanie z AIEC (<i>adherent-invasive E. coli</i>), który replikuje się jednocześnie z makrofagami, prowadząc do powstawania ziarniniaka 	<ul style="list-style-type: none"> - nieznanne
Listeria monocytogenes	<ul style="list-style-type: none"> - pojedynczy przypadek wystąpienia tego organizmu w ścianie jelita grubego perforowanego w przebiegu WZJG 	<ul style="list-style-type: none"> - występowanie DNA listerii u chorych z IBD oraz pacjentów zdrowych, rzadko znajdująca w biopsjach
Chlamydia	<ul style="list-style-type: none"> - DNA chlamydii częściej spotykane w tkance niezmięnionej zapalnie u chorych z ChLC 	<ul style="list-style-type: none"> - brak różnic w mianach przeciwciał u chorych oraz w grupie kontrolnej; niejednoznaczne doniesienia o obecności DNA chlamydii w materiale histologicznym z jelit
Blastocystis hominis	<ul style="list-style-type: none"> - opisano przypadki pacjentów z objawami podobnymi do objawów IBD - wzrost częstości występowania IBD w Europie przypisywany transmisji czynnika zakaźnego przez personel wojskowy oraz biznesmenów 	<ul style="list-style-type: none"> - nieznanne
Clostridium difficile	<ul style="list-style-type: none"> - wzrost częstości infekcji <i>Clostridium</i> w aktywnej postaci IBD, mimo że bakteria ta nie bierze udziału w patogenezie 	<ul style="list-style-type: none"> - nieznanne

wirus różyczki, odry	<ul style="list-style-type: none"> - powiązanie szczepienia przeciwko odrze z rozwojem IBD w badaniach kohortowych - wysoki współczynnik występowania ChLC w przypadku ciąży przebiegających z infekcją - utrzymywanie się infekcji u chorych z IBD 	- powiązanie ze szczepieniami nie zostało potwierdzone w badaniach przypadków; powiązanie ciąży z infekcją wirusową nie zostało potwierdzone w późniejszych badaniach z użyciem technik PCR
wirus świnki	<ul style="list-style-type: none"> - powiązanie między świnką przechorowaną w dzieciństwie a WZJG w wieku dorosłym (badania kohortowe) 	- brak różnic w mianach przeciwciał w próbkach jelitowych pacjentów i grupy kontrolnej
wirus Epstein-Barr	<ul style="list-style-type: none"> - zwiększona liczba limfocytów zainfekowanych EBV w jelicie chorych z WZJG oraz w mniejszym stopniu u pacjentów z ChLC - zwiększone ryzyko białaczki w przebiegu IBD (możliwy udział EBV) 	- nieznane
cytomegalowirus	<ul style="list-style-type: none"> - infekcja CMV może przebiegać jak rzut IBD, ale ani terapia przeciwwirusowa ani immunosupresja nie są skuteczne 	- nieznane
Saccharomyces cerevisiae	<ul style="list-style-type: none"> - przeciwciała ASCA są powiązane z ChLC 	- odpowiedź immunologiczna może odzwierciedlać odpowiedź na nierozpoznany antygen
helminy	<ul style="list-style-type: none"> - domniemany czynnik protekcyjny w IBD (w krajach nisko rozwiniętych, gdzie powszechne są pasożyty wywołane przez nicienie, częstość zachorowań na IBD jest mniejsza) - pasożyty wywołane przez nicienie znacznie poprawiają stan kliniczny gryzoni chorych na zapalenia jelit 	- nieznane
Helicobacter pylori	<ul style="list-style-type: none"> - rzadziej występujące infekcje <i>H. pylori</i> u chorych z IBD sugerują ich efekt protekcyjny 	- nieznane

O udziale czynników środowiskowych w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit świadczą różnice w zachorowaniu w poszczególnych grupach etnicznych oraz tych samych grup ludności żyjących w innych regionach geograficznych. Istnieje niezliczona ilość zmian środowiskowych, które mogą być przypisane „hipotezie higieny”, do których zaliczyć można: lepsze warunki mieszkaniowe, bezpieczeństwo żywności

i wody, poprawę warunków higienicznych i sanitarnych, szczepionki, stosowanie antybiotyków, a co za tym idzie zmniejszenie ilości infekcji. W tym samym czasie zmiany te jednak przyczyniły się do postępującego wzrostu występowania alergii i chorób autoimmunologicznych. Wiele uwagi poświęcono substancjom chemicznym i antygenom zawartym w pożywieniu. Uderzający jest fakt wzrostu zachorowalności w ciągu ostatnich lat w krajach rozwiniętych ekonomicznie oraz w krajach mniej rozwiniętych, ale o wzrastającej produkcji przemysłowej. Wzrost zapadalności na NCHZJ (IBD) odzwierciedla polepszenie diagnostyki, ułatwienie dostępu do służby zdrowia oraz wzrost świadomości zagrożenia IBD wśród lekarzy i społeczeństwa. Dużą rolę odegrała również zmiana stylu życia oraz diety. Hou JK i współautorzy przeprowadzili badania na grupie 2 609 osób z nieswoistymi zapaleniami jelit (1 269 osób z CD, 1 340 osób z UC) i ponad 4 000 osób w grupie kontrolnej, w których wykazali dodatni związek między wysokim spożyciem tłuszczów nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), całkowitej ilości kwasów tłuszczowych omega-3, omega-6, mono- i disacharydów oraz mięsa ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia CD i UC. Wysokie spożycie błonnika i owoców wiązało się ze spadkiem ryzyka wystąpienia CD, duże spożycie warzyw natomiast wiązało się z obniżeniem ryzyka wystąpienia UC. Czynniki dietetyczne, takie jak rozprzestrzenianie się „zachodniego” modelu diety, bogatej w tłuszcze i białka, ubogiej w owoce i warzywa, może być zatem związana ze wzrostem częstości występowania zapalnych chorób jelit [81].

U pacjentów cierpiących na nieswoiste choroby zapalne jelit często występuje problem dotyczący niedoboru składników żywieniowych, wynikający ze zmniejszonego spożycia lub upośledzonego wchłaniania w zmienionych przez proces chorobowy fragmentach jelita bądź w wyniku braku części jelita usuniętych operacyjnie. Obserwuje się niedowagę, hypoalbuminemię, nietolerancję laktozy, niedokrwistość (najczęściej spowodowaną niedoborem żelaza, kwasu foliowego oraz witaminy B12), niedobory witamin (zwłaszcza witamin z grupy B oraz rozpuszczalnych w tłuszczach: A, D, E, K), składników mineralnych, mikro- i makroelementów (wapnia, magnezu, cynku). Nie wykazano jednak jednoznacznie, aby dieta mogła zapobiegać nawrotom NCHZJ (IBD). Nie potwierdzono również, aby takie działanie miały kwasy omega-3 przyjmowane w formie doustnej (badanie EPIC-1, EPIC-2; Epanova Program in Crohn's Study) [127]. W ostatnich latach naukowcy oceniali kliniczną wartość zastosowania preparatu

maślanu sodu (Debutir) u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Argumentami przemawiającymi za słuszością zastosowania tego suplementu diety są znane efekty biologiczne maślanu takie jak: dostarczanie energii dla kolonocytów, poprawa szczelności nabłonka oraz nasilenie procesów gojenia i regeneracji nabłonka jelit. Istotne jest też bezpośrednie działanie przeciwzapalne maślanu, które powoduje obniżenie stężenia cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-8, TNF- α [6,10]. Kwas masłowy zaliczany do grupy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (*short chain fatty acid* – SCFA) jest obecny powszechnie w diecie (mleko, przetwory mleczne, serwatki, produkty fermentowane), jednakże w ilościach, niemających wpływu na nabłonek jelita cienkiego i grubego. Za uzasadnione uznano zatem zastosowanie preparatów maślanu jako substancji wspomagającej w postępowaniu dietetycznym w nieswoistych zapalnych chorobach jelit, zwłaszcza po rozległych resekcjach jelit. Preparaty maślanu sodu powinny być stosowane przez co najmniej 3 miesiące aby uzyskać pożądany efekt terapeutyczny. Dodatkowym pozytywnym faktem jest możliwość jego stosowania we wszystkich grupach wiekowych, bez istotnych przeciwwskazań. Preparat wykazuje bardzo niską toksyczność, brak istotnych skutków ubocznych i działań niepożądanych [10].

Obiecującym kierunkiem badań jest również stosowanie probiotyków w różnych jednostkach chorobowych, w tym również chorobach dotyczących przewodu pokarmowego. W wytwarzaniu preparatów probiotycznych (gr. pro bios – „dla życia”) biorą udział następujące mikroorganizmy produkujące kwas mlekowy: bakterie *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* sps. oraz drożdżaki z rodzaju *Saccharomyces* i inne: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus*. Mechanizm działania probiotyków jest dwukierunkowy: stymulacja rozwoju tkanki limfoidalnej (GALT – *gut-associated lymphoid tissue*) oraz hamowanie rozwoju drobnoustrojów patogennych. Autorzy licznych analiz konkludują jednak, iż nie ma obecnie przesłanek do stosowania probiotyków celem utrzymania remisji choroby Leśniowskiego-Crohna [41,120]. Kruis W i wsp. dowiedli jednak o skuteczności szczepu *Escherichia coli* w utrzymywaniu remisji wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, gdzie probiotyk okazał się być równie skuteczny jak preparat mesalazyny [41,99].

Niektóre z czynników środowiskowych mają wpływ jedynie na nasilenie przebiegu choroby, nie wpływają jednak na predyspozycję do jej ujawnienia. Palenie papierosów

jest przykładem czynnika, który zwiększa ryzyko nawrotów ChLC (CD), stanowiąc jednocześnie czynnik ochronny dla rozwoju WZJG (UC) [21,25,28]. Osoby, które nigdy nie paliły lub byli palacze są obarczeni wyższym ryzykiem zachorowania na WZJG, osoby palące – wystąpieniem ChLC. Oprócz wpływu na podatność na wystąpienie NCHZJ, palenie tytoniu może modyfikować przebieg kliniczny choroby, zwiększając ryzyko nawrotu [131]. Nam SY i współpracownicy na podstawie badań własnych stwierdzili, że częstość występowania NCHZJ wrasta ze wzrostem stresu psychicznego i jest niepodważalnie związana z płcią żeńską oraz paleniem papierosów. Natomiast alkohol, wartości body mass index (BMI), istnienie nadciśnienia tętniczego, cukrzyca, używanie środków uspokajających nie ma związku z częstością występowania nieswoistych chorób zapalnych jelit [126]. Wielowymiarowe analizy z wykorzystaniem ankiety ogólnej zdrowia (General Health Questionnaire), Kwestionariusza Osobowości Zuckerman-Kuhlman (ZKPQ - Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire), testu uzależnienia od tytoniu wg Fagerstroma (mierzy głębokość uzależnienia biologicznego od nikotyny) Hyphantis T i współautorzy donoszą, że osobowość typu „impulsive sensation seeking” („impulsywny, poszukujący doznań”, ImpSS) w połączeniu z paleniem papierosów jest skorelowana silniej u pacjentów z CD niż u chorych z UC. Związek ImpSS z uzależnieniem od nikotyny był również większy u palaczy z CD niż u pacjentów z UC [82]. Konturek PC i wsp. określili skutki jakie stres wywołuje na fizjologię przewodu pokarmowego (interakcja na osi mózg-jelito); obejmują one: zmiany motoryki przewodu pokarmowego, wzrost percepcji trzewnej, zmiany wydzielnicze, wzrost przepuszczalności jelit, negatywne skutki dla regeneracji błony śluzowej żołądka i przepływu krwi przez śluzówkę oraz negatywny wpływ na mikroflorę jelita [94]. W kilku badaniach zwrócono uwagę, na potencjalny niewielki wpływ stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych u kobiet jako czynnika predysponującego do rozwoju NCHZJ. Ryzyko to bowiem znika po odstawieniu terapii. Często nadużywana grupa leków – niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), poddana została obserwacji ze względu na możliwy związek ich stosowania z występowaniem NCHZJ (IBD) wskutek wzrostu przepuszczalności ściany jelita pod ich wpływem [131].

Nie wykazano dotychczas aby jeden konkretny czynnik powodował rozwój nieswoistych zapaleń jelit, jednak u osób predysponowanych genetycznie, oddziaływanie jednego lub wielu czynników środowiskowych może przyczyniać się do

ujawnienia procesu chorobowego. U podłoża rozwoju nieswoistych zapaleń jelit mogą leżeć różne zaburzenia genetyczne, ale do wywołania formy pełnoobjawowej choroby niezbędne jest współistnienie dodatkowych czynników jakimi mogą być: leki, infekcje, zaburzenia metaboliczne oraz zaburzenia immunologiczne [59,160].

1.1.3.2. Czynniki immunologiczne

W patofizjologii nieswoistych zapaleń jelit uwzględnia się też zaburzenia w reakcji zapalnej błony śluzowej. Ważną rolę regulacyjną w nieswoistych zapaleniach jelit odgrywają, podobnie jak w innych przewlekłych procesach zapalnych, cytokiny prozapalne. Wykazano wzrost stężenia cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α w WZJG (UC), które odpowiadają za lokalnie występujący proces zapalny. Rolą IL-10 i TGF β jest natomiast hamowanie reakcji immunologicznej w błonie śluzowej jelita grubego. Szczególną rolę w patogenezie WZJG (UC) przypisuje się przewadze cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) nad cytokinami o właściwościach przeciwwzapalnych (IL-4, IL-10) [30,74,123]. Wyróżnia się 3 rodzaje limfocytów pomocniczych, do których zaliczamy Th1, Th2 i Th17. Wykazano, że Th1 i Th17 odgrywają większą rolę w patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna, natomiast do wzmożonej ekspresji subpopulacji limfocytów Th2 o fenotypie CD4+ dochodzi we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [7,85,108,150]. Cytokiny o działaniu prozapalnym inicjują i podtrzymują miejscowy stan zapalny, natomiast cytokiny przeciwwzapalne zmniejszają odpowiedź zapalną przez obniżenie wytwarzania cytokin prozapalnych [150].

Unikalną cechą w przebiegu ChLC jest defekt w przebiegu ostrej fazy zapalenia. Badania eksperymentalne dowiodły iż wskutek uszkodzenia błony śluzowej odbytnicy bądź jelita cienkiego dochodzi do zmniejszonej rekrutacji neutrofilów, zmniejszonego stężenia IL-1- β oraz IL-8 oraz zmniejszonego przepływu krwi w obrębie błony śluzowej jelita w grupie kontrolnej [65].

Charakterystyczną cechą nieswoistych zapaleń jelit jest przewlekły proces zapalny dotyczący ściany jelita grubego. Naciek zapalny składa się głównie z makrofagów, neutrofilów oraz komórek plazmatycznych. W chorobie Leśniowskiego-Crohna dominuje aktywacja subpopulacji komórek Th1, które wspomagają odpowiedź komórkową. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego zaobserwowano aktywację zarówno komórek Th1 jak i Th2, przeważa humoralny typ odpowiedzi. IFN- γ , IL-17,

IL-22 są głównymi cytokinami, których relatywna ważność w przebiegu zapalenia w ChLC jest niepewna. W WZJG dochodzi do wzmożonej produkcji IL-13 i być może IL-5. Kolejnymi mediatorami wpływającymi na regulację wydzielania mediatorów procesu zapalnego są następujące cytokiny: TNF α , IL-1- β , IL6 oraz TL1A (ang. tumor necrosis factor –like ligand) [177].

Goldstein JI i wsp. zaobserwowali obniżoną ekspresję GM-CSF receptora (CD116) na granulocytach i monocytach pacjentów zarówno z ChLC jak i WZJG w porównaniu do grupy kontrolnej oraz pacjentów z zespołem jelita drażliwego i reumatoidalnym zapaleniem stawów. U podstaw tego procesu może leżeć mechanizm transkrypcji. Obniżona ekspresja CD116 jest cechą różnicującą NCHZJ i wpływa na związaną z nią nieprawidłowość we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej dotyczącą GM-CSF [65].

NKG2D (ang. natural killer group 2 member D) jest czynnościowym markerem komórek CD4⁺T, które produkują IL17 u pacjentów z ChLC poprzez stymulację TCR i NKG2D. Poprzez zablokowanie NKG2D można zredukować nasilenie procesu zapalnego w obrębie jelita u pacjentów ChLC [143].

Odkryciem ostatnich lat jest rola IL-10 jako kluczowego mediatora w utrzymywaniu homeostazy jelit. Paul G i wsp. wyjaśniają znaczenie sygnalizacji IL-10 w odpowiedzi immunologicznej jelit zarówno w stanie zdrowia jak i choroby, biologiczną rolę IL-10, jej dysregulacji w NCHZJ (IBD) i jej udział w procesie zapalnym poprzez retikulum endoplazmatyczne będące reakcją na stres. Ostatnie badania pozwoliły zidentyfikować mutacje receptora IL-10, który jest związany z wczesnym początkiem zapalenia jelita. Pomimo, że inny niż genetyczny wariant receptora IL-10, gen IL-10 i STAT3 są także związane z NCHZJ (IBD), podkreśla się jednak zaangażowanie IL-10 w kaskadzie sygnalizacji w patogenezie ChLC i WZJG [145].

W tabeli 3 przedstawiono rolę wybranych cytokin i linii komórkowych biorących udział w ich produkcji u pacjentów z NCHZJ (IBD), z wyróżnieniem ChLC i WZJG.

Tabela 3 Rola cytokin i rodzajów komórek biorących udział w ich produkcji u pacjentów z IBD [159]

Cytokiny	WZJG	ChLC	Komórki produkujące
TNF- α	podwyższony	podwyższony	makrofagi
TL1 α	nieznana	podwyższony	Th1
IL-1 β	współczynnik IL-1ra IL-1	współczynnik IL-1ra IL-1	makrofagi
IL-6	podwyższony	podwyższony	makrofagi, DC, Th17 i inne
IL-18	nie	tak (nie u wszystkich chorych)	makrofagi
TGF- β	niejasna	niejasna	Th0, Th3, Treg
IL-10	niejasna	tak (podwyższony)	Tr1 i Treg
IL-4	niejasna	niejasna	Th2, NK
IL-12	podwyższony	podwyższony	makrofagi, DC
IL-23	tak	tak	makrofagi, DC
IL-27	niejasna	podwyższony	APC
IL-17	podwyższony	podwyższony	Th17
IL-13	podwyższony	nie	Th1, NK
IL-5	podwyższony	nie	Th2, NK

Celem oznaczenia stężenia cytokin w surowicy wykorzystuje się metodę immunoenzymatyczną ELISA. W ostatnich latach dokonał się rozwój cytometrii przepływowej, która umożliwia badanie komórek, z oceną stężenia cytokin, białek w surowicy krwi, w osoczu oraz w moczu, przy czym swoistość i czułość obu metod jest porównywalna [86]. Do zalet cytometrii przepływowej należą: wykonywanie analizy przyżyciowo, na komórkach nieizolowanych oraz możliwość oznaczania bezwzględnej liczby komórek co w efekcie eliminuje występowanie potencjalnych

źródeł błędów [88]. Wydaje się oczywistym fakt, iż proces zapalny toczący się w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit jest regulowany przez wiele mediatorów, cytokin, chemokin, które współuczestniczą w patomechanizmie ich powstawania.

Limfocyty Th1 produkują IL-2, IFN γ i limfotoksynę, natomiast limfocyty Th2 - IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13.

IL-2 należy do grupy cytokin prozapalnych. Jest wytwarzana głównie przez limfocyty Th1. Rola IL-2 opiera się na proliferacji i różnicowaniu limfocytów T, bierze udział w powstawaniu pierwotnej odpowiedzi immunologicznej limfocytów B, zwiększa wytwarzanie immunoglobulin, pobudza wytwarzanie IL-4, IL-5, IFN γ , aktywuje komórki NK [28,137].

IL-4 produkowana przez komórki Th2 i komórki tuczne. Stymuluje wzrost i różnicowanie limfocytów T i B. Obniża produkcję cytokin prozapalnych i metaloproteinaz.

IL-6 jest wydzielana przez monocyty, makrofagi, limfocyty T i B, komórki śródbłonna. Prowadzi do różnicowania limfocytów B do komórek plazmatycznych, aktywuje limfocyty T, pobudza komórki wątrobowe do produkcji białek ostrej fazy [28,138]. Stężenie IL-6 zwiększa się w surowicy pacjentów z aktywnym WZJG (UC), obniża się natomiast w fazie remisji. Stężenie jej koreluje z ciężkością i rozległością zmian zapalnych w jelitach [150].

IL-10 należy do grupy cytokin przeciwzapalnych, jest wytwarzana przez limfocyty B i Th2, makrofagi, monocyty, eozynofile, komórki tuczne i keratynocyty. Obniża produkcję IFN γ i IL-2 przez hamowanie wytwarzania limfocytów Th1, hamuje wydzielanie mediatorów prozapalnych przez eozynofile i komórki tuczne, pobudza wzrost i aktywację limfocytów B, typu Tc (cytotoksycznych) oraz komórek NK (natural killers). Hamuje również ekspresję cząsteczek MHC II na monocytach oraz zmniejsza ich zdolność prezentowania antygenów [28,137,150].

TNF α (tumor necrosis factor α , czynnik martwicy nowotworów), należy do grupy cytokin (prozapalnych), substancji białkowych biorących udział w reakcji zapalnej i immunologicznej organizmu. TNF α należy do nadrodziny białek TNF/TNF-R, do których należą zarówno ligandy jak i receptory. Geny dla TNF zlokalizowane są na chromosomie 6 p213 wśród genów głównego układu zgodności tkankowej (MHC).

TNF α produkowany jest głównie przez komórki źerne: monocyty, makrofagi, zaś dodatkowym źródłem są: neutrofile, keratynocyty, mastocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna oraz kardiomiocyty [57,66,84,114]. Bodźcem do uwalniania TNF α przez makrofagi są lipopolisacharydy ściany komórkowej bakterii oraz INF γ , IL-1, natomiast substancjami hamującymi wydzielanie TNF α są glikokortykosteroidy, IL-4, IL-10, PGE2. Efekty biologiczne TNF α :

- działanie przeciwwirusowe
- działanie przeciw pasożytnicze
- wzmaganie proliferacji i różnicowania limfocytów T, limfocytów B, komórek NK
- powoduje wzrost syntezy cytokin: INF γ , IL-1, IL-6, prostaglandyn
- indukuje ekspresję cząsteczek układu MHC I i MHC II
- indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych i chemokin
- bierze udział w tworzeniu wtórnych narządów limfatycznych (węzłów chłonnych, kąpek Peyera, śledziony)
- bierze udział w procesie odrzucania przeszczepów oraz reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi (GVHR)
- hamuje aktywność lipazy lipoproteinowej w tkance tłuszczowej (zniszczenie syntezy lipidów w komórkach tłuszczowych)
- stymuluje wzrost syntezy białek ostrej fazy (CRP) w wątrobie
- przyczynia się do insulinooporności
- nasila uwalnianie CRH z podwzgórza hamując apetyt i wywołując gorączkę
- stymuluje proliferację fibroblastów, aktywację osteoklastów, pobudzenie angiogenezy
- TNF α w stężeniach fizjologicznych poprzez TNFR2 zwiększa migrację komórek nabłonkowych jelita (korzystny wpływ na integralność nabłonka jelit); natomiast w wysokich stężeniach poprzez receptor TNFR1 – hamuje proces migracji tych komórek
- wzmacnia procesy włóknienia w tkance jelita
- wywiera troficzny wpływ na powstawanie grudek chłonnych w śluzówce jelita [66,114,118,198].

INF γ należy do grupy cytokin prozapalnych. Jest produkowany przez komórki NK i limfocyty T (INF γ wzmacnia ich cytotoksyczność) pod wpływem stymulacji IL2, IL12, IL15, IL18. Wykazuje właściwości przeciwwirusowe. Jego rola polega również na zwiększaniu ekspresji antygenów MHC, B7 oraz receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał. Aktywuje ekspresję innych cytokin prozapalnych: IL1, IL6, TNF α [120].

Tolerancję antygenów drobnoustrojowych zapewniają cytokiny IL10 i TGF β , które hamują odpowiedź immunologiczną i różnicowanie komórek efektorowych: Th1, Th2, Th17. Cytokiny o właściwościach hamujących wytwarzane są przez komórki regulatorowe T (Treg) przy współudziale TGF β i kwasu retinowego, a głównym miejscem powstawania są kępkki Peyera i węzły chłonne krezki. U zwierząt doświadczalnych, zaburzenia różnicowania komórek Treg bądź brak odpowiedzi na ich cytokiny są powodem powstania procesu zapalnego jelit. Niezmienną cechą w NCHZJ (IBD) jest występowanie w tkankach komórek T o fenotypie CD4+. Skutkiem ich pobudzenia jest różnicowanie w pomocnicze komórki T: Th1, Th2, Th17 a także komórki regulatorowe (Treg). Tak powstałe w kępkach Peyera i węzłach chłonnych komórki wędrują następnie do blaszki właściwej błony śluzowej jelit, gdzie wydzielają charakterystyczne cytokiny efektorowe. Podgrupy komórek CD4+ wydzielają odpowiednie cytokiny efektorowe: komórki Th1 wydzielają cytokiny efektorowe - IFN γ , Th2 – IL4, IL5, IL13, Th17 – IL17, IL21, IL22, IL26, Treg – IL10, TGF β [18].

Defekty odpowiedzi immunologicznej, które dotyczą w szczególności limfocytów T pomocniczych oraz wzrostu cytokin IFN γ , IL-12, TNF α wskazują na bezsporną ich rolę w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit. Wielokierunkowe działanie wyżej wymienionych składowych układu immunologicznego pozostaje nadal źródłem zainteresowania wielu badaczy na świecie, ze względu na rolę jaką w chwili obecnej przypisuje się leczeniu biologicznemu NCHZJ (IBD), gdyż za cel współczesnej farmakoterapii postawiono nie tylko uzyskanie remisji choroby, ale przede wszystkim jej jak najdłuższe utrzymanie. Dalsza obserwacja grupy chorych z NCHZJ (IBD) pomoże w przyszłości wyjaśnić również rokowniczą wartość przedstawionych parametrów.

1.1.3.3. Czynniki genetyczne

O udziale czynnika genetycznego świadczy rodzinne występowanie nieswoistych zapaleń jelit. Od 5-20% pacjentów ma krewnych I stopnia chorych na WZJG (UC) bądź na ChLC (CD). Potwierdzają to również badania bliźniąt jednojajowych - 20-50% zgodności w CD, 14-19% w UC, dwujajowych – 0-7% w CD i UC [27,131]. Warto również podkreślić, że obserwowana zgodność dotycząca bliźniąt z CD jest większa niż dotycząca występowania cukrzycy typu 1, astmy czy schizofrenii [131]. Częstotliwość rodzinnego występowania NCHZJ (IBD) zmienia się w zależności od stopnia i rodzaju pokrewieństwa. Zjawiskiem kontrowersyjnym jednak pozostaje fakt rozwoju NCHZJ

w młodszym wieku u potomstwa niż u rodziców. Faktem potwierdzającym udział czynników genetycznych jest również fakt, że NCHZJ (IBD) występują częściej u Żydów aszekenezyjskich bez względu na położenie geograficzne ich miejsca zamieszkania [131]. Osiągnięciem ostatnich lat jest ustalenie *loci* genów podatności na nieswoiste zapalenia jelit na chromosomach 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 i X. Regiony, w których się znajdują ponumerowane są w kolejności od IBD 1 do IBD 9.

U niektórych chorych z *enterocolitis* stwierdzono mutacje genów IL10RA oraz IL10RB kodujących receptory IL10 R1 oraz IL10 R2, co prowadzi do braku efektu przeciwzapalnego interleukiny IL-10 [64,131].

W 2001r. odkryto pierwszy gen podatności nazwany wówczas NOD2 (ang. nucleotide-binding oligomerisation domain), obecnie znany jako CARD15 (ang. caspase activating requirement domain) lub jako NOD2/CARD15 zlokalizowany na chromosomie 16q12, w locus IBD1. Jest to wewnątrzkomórkowy receptor, do którego ekspresji dochodzi w makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych i komórkach Panetha. W odpowiedzi na składnik ściany komórkowej bakterii MDP (muramyl dipeptide) aktywuje czynnik jądrowy κ B (NF κ B, nuclear factor κ B) i uwalnianie prozapalnych cytokin. Skutkiem mutacji genu NOD2/CARD15 jest zahamowanie reakcji obronnej wobec fizjologicznej flory bakteryjnej jelit i stałe pobudzenie ich układu immunologicznego [28,149,155,167,195,196,202].

W 2004r. opisano nowe geny mające wpływ na aktywność NCHZJ (IBD) – DLG5 na 10q23 oraz SLC22A4 i SLC22A5 (IBD5). Postęp technologiczny w analizie sekwencji DNA, szczególnie przy użyciu metody GWA (ang. genom-wide association), doprowadził do odkrycia ponad 30 genów podatności na rozwój NCHZJ (IBD), m.in. IL23R, ATG16L1, IRGM. W ChLC (CD) stwierdzono warianty genu ATG16L1, co może wskazywać na związek choroby z defektem autofagii [195].

1.1.4. Objawy i przebieg NCHZJ

1.1.4.1. Wrzodzące zapalenie jelita grubego

Zwykle pierwszymi objawami WZJG (UC) są biegunka (liczba wypróżnień może sięgać do 20 w ciągu doby) i domieszka krwi w stolcu. Spośród innych objawów należałoby wymienić: bóle brzucha, utratę masy ciała, gorączkę, obrzęki, osłabienie oraz brak łaknienia. Bóle brzucha najczęściej lokalizują się w okolicy lewego dołu biodrowego i wraz z parciem na odbytnicę pojawiają się przed wypróżnieniem, przy czym oddanie stolca przynosi choremu znaczną ulgę. Osoby starsze mogą zgłaszać nietrzymanie stolca bądź zaparcie stolca. Pacjenci ze zmianami ograniczonymi do odbytnicy mogą mieć prawidłowy rytm wypróżnień względnie zaparcia stolca. Jedynymi objawami są wówczas krwawienie z dolnego odcinka przewodu pokarmowego, bolesne parcie na stolec oraz uczucie niepełnego wypróżnienia. Stan przedmiotowy chorego jest zazwyczaj dobry. W badaniach laboratoryjnych najczęściej obserwuje się niedokrwistość (ok. 60% chorych). WZJG (UC) przebiega w postaci ostrych rzutów i okresów pełnej remisji.

Przyczynami zaostrzenia choroby są zazwyczaj stropy psychiczne, leki przeciwbólowe (zwłaszcza dotyczy to niesteroidowych leków przeciwzapalnych), zmiany w sposobie odżywiania, zakażenia pokarmowe, infekcje dotyczące innych narządów leczone antybiotykami oraz zaprzestanie przyjmowania leków podtrzymujących remisję [20,94,95,183,186].

Postęp w terapii przyczynił się do znacznego obniżenia śmiertelności z powodu WZJG (UC), jednak jej przebieg jest niekiedy trudny do przewidzenia, a rokowanie co do wyleczenia niepomyślne. WZJG (UC) jest stanem zwiększonego ryzyka rozwoju raka jelita grubego. Do jego rozwoju predysponują następujące czynniki: długi czas trwania choroby, rozległe zajęcie jelita grubego, początek choroby w dzieciństwie, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC) oraz pozytywny wywiad rodzinny w kierunku chorób nowotworowych przewodu pokarmowego. U chorych z WZJG rak jelita grubego powstaje najczęściej w ogniskach dysplazji w błonie śluzowej (ang. dysplasia associated lesions or masses – DALM). Bardzo istotne znaczenie ma więc profilaktyka raka oraz nadzór endoskopowy wraz z diagnostyką dysplazji. W chorobie, która obejmuje całe jelito grube nadzór endoskopowy wykonuje się po 8 latach od rozpoznania WZJG, przy lewostronnych zmianach zapalnych – po 15 latach (4 wycinki błony śluzowej co 10cm długości jelita) [17,58,74,111,132]. W wyniku rozważań grupy

ekspertów stanowiącej Sekcję Jelitową Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (2010 rok) wysunięto następujące wnioski dotyczące chemoprewencji raka jelita grubego:

- regularne stosowanie preparatów 5-ASA (powodujących hamowanie proliferacji komórek nabłonka jelitowego i nasilenie ich apoptozy) może zmniejszać ryzyko wystąpienia raka jelita grubego w WZJG, a wielkość efektu ochronnego zależy od dawki (nie ma zaś wystarczających dowodów na takie działanie w przypadku ChLC)
- działanie chemoprewencyjne w WZJG wykazuje zarówno sulfasalazyna jak i mesalazyna, przy czym chemoprewencyjny efekt działania mesalazyny jest większy niż sulfasalazyny (biorąc pod uwagę jednakowe dawki w przeliczeniu na zawartość 5-ASA)
- dawka mesalazyny stosowana celem chemoprewencji powinna być nie mniejsza niż 1,5g na dobę
- w ramach prewencji raka jelita grubego, pacjentom w okresie remisji w przypadku WZJG, którzy przyjmują azatioprynę (lub 6-merkaptopurynę) należy zalecić jednoczesowe przyjmowanie preparatów 5-ASA
- u pacjentów z NCHZJ i współistniejącym PSC działanie chemoprewencyjne może mieć kwas ursodezoksycholowy (przy czym pamiętać należy o szkodliwości wysokich dawek tego leku)
- nie ma natomiast wystarczających dowodów na chemoprewencyjne działanie azatiopryny, 6-merkaptopuryny, leków biologicznych anty TNF α u pacjentów z NCHZJ [203].

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest chorobą przewlekłą, wieloletnią, związaną ze zwiększonym ryzykiem rozwoju dysplazji i raka jelita grubego. Ryzyko zachorowania na raka jelita grubego oraz zmian do niego prowadzących (dysplazja) wzrasta wykładniczo z czasem trwania i zakresem zmian choroby. Dla wczesnego wykrywania raka jelita grubego związanego z WZJG, rekomendowany jest nadzór endoskopowy, ponieważ pacjentów z WZJG uznaje się za grupę podwyższonego ryzyka wystąpienia raka jelita grubego. W związku z trudnością wykrycia zmian dysplastycznych w badaniu endoskopowym potrzebne jest odnalezienie odpowiednich markerów celem selekcji pacjentów o podwyższonym ryzyku wystąpienia raka jelita grubego. Próbę wykrycia takich markerów podjęli Hamouda HE i wsp. badając wartość poziomu: AOPP (ang. *advances oxidation protein products*, białkowe produkty utleniania, białko o właściwościach prozapalnych, białkowy marker stresu oksydacyjnego), GSH (ang.

glutathione, glutation), MT (ang. *metallothioneins*, metalotioneiny, nadrodzina małych białek biorących udział w podstawowych procesach komórkowych: proliferacji, apoptozie) i p53Ab (przeciwciała p53) dla wczesnego wykrycia dysplazji u pacjentów z WZJG. Grupę badawczą stanowiło 30 pacjentów (15 osób bez dysplazji, 15 osób z dysplazją w błonie śluzowej jelita grubego) z WZJG z *University Hospital, Egypt* oraz grupa kontrolna 15 osób zdrowych. Gen p53 jest supresorowym genem, którego mutacje w raku u ludzi są obserwowane najczęściej. Gromadzenie produktów genu p53 w komórkach nowotworowych, może inicjować odpowiedź immunologiczną z wytworzeniem krążących przeciwciał anty-p53 (p53Ab). Wcześniejsze obserwacje p53Ab dokonane w surowicy pacjentów z rakiem: płuc, wątroby, jelita grubego, piersi, nie tylko poruszyły kwestię związku pomiędzy mutacją genu p53, akumulacją p53 i humoralną odpowiedzią anty-p53, jak również otworzyły drogę rozwoju nowych markerów w diagnozowaniu raka.

W wyniku przeprowadzonych badań, stwierdzono wzrost poziomu AOPP oraz p53Ab u pacjentów z WZJG zarówno z dysplazją jak i bez dysplazji w błonie śluzowej jelita grubego, jednak ze znacząco większymi wartościami tych parametrów u osób z WZJG z dysplazją w błonie śluzowej jelita grubego. Zaobserwowano również zmniejszenie poziomu GSH u pacjentów z WZJG z towarzyszącą dysplazją oraz dodatnią korelację między poziomem ekspresji MT oraz ciężkością stanu zapalnego (wzrost stężenia MT w obu grupach chorych z WZJG). Podsumowując powyższe badanie, autorzy wnioskują, że stres oksydacyjny odgrywa znaczącą rolę w patogenezie WZJG i jest związany z procesem karcinogenezy, zaś poziom p53Ab może pomóc we wczesnym wykrywaniu dysplazji u pacjentów z WZJG, jednak potrzebne jest przeprowadzenie badań na dużej populacji aby porównać ich czułość i swoistość [70].

1.1.4.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna

Objawy choroby Leśniowskiego-Crohna zależą od lokalizacji, rozległości i stopnia zaawansowania zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym. Choroba może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego poczynając od jamy ustnej aż do odbytu [115]. W przypadku zajęcia przełyku wywołuje dysfagię. Jeśli chorobą objęty jest żołądek i dwunastnica objawy imitują często wrzód trawienny. Najczęstszą lokalizacją ChLC (CD) jest jelito kręte (50% przypadków), jelito cienkie i grube są zajęte jednocześnie w 30-40% przypadków. Dominującymi objawami są biegunka, bóle brzucha, rzadko domieszka krwi w stolcu, gorączka pojawia się u ok. 1/3 chorych. W

przypadku rozległego zajęcia jelita cienkiego występuje biegunka o charakterze tłuszczowym (steatorrhoea). Z biegiem czasu dołączają się: spadek masy ciała, wyniszczenie, a w przypadkach z hipoalbuminemią – obrzęki. Dla lokalizacji krętniczokątnicznej typowy jest skurczowy ból w prawym dolnym kwadrancie jamy brzusznej. Cechą charakterystyczną jest również samoistne tworzenie się przetok. Proces zapalny prowadzi w konsekwencji do zmniejszenia światła jelita, upośledzenia pasażu treści jelitowej. Gdy proces zapalny rozprzestrzenia się poza ścianę jelita dochodzi do powstania ropni śródbrzusznych. U około 30% chorych stwierdza się wyczuwalny guz w prawym dole biodrowym. Obserwowane mogą być zmiany w okolicy odbytu w postaci: owrzodzeń, szczelin, ropni i przetok okołodbytowych [21,95,157]. Śmiertelność jest niska, jednak wieloletni przebieg choroby może powodować znaczne inwalidztwo.

1.1.5. Diagnostyka NCHZJ

1.1.5.1. Badanie przedmiotowe

Stan przedmiotowy większości pacjentów jest dobry. W badaniu zwracamy uwagę na cechy odwodnienia (ciśnienie tętnicze, tętno), objawy świadczące o niedokrwistości (bładość powłok ciała). Dokonujemy pomiaru temperatury ciała, oceniamy stan odżywienia. W badaniu jamy brzusznej poszukujemy miejscowej bądź rozlanej bolesności. W badaniu per rectum może być obecny ślad krwi na rękawiczce.

1.1.5.2. Badania laboratoryjne i serologiczne

Zaleca się wykonanie podstawowych badań laboratoryjnych: oznaczając morfologię krwi obwodowej, poziom białka CRP w surowicy krwi, OB, poziom elektrolitów, proteinogram. Przydatne może być również oznaczenie przeciwciał pANCA oraz pASCA. Według nowych wytycznych ECCO 2010 zaleca się wykonywanie oznaczenia stężenia markerów zapalenia w kale (kalprotektyny, laktoferyny), bowiem wykazano, że kalprotektyna koreluje z aktywnością procesu zapalnego jelit [142].

1.1.5.3. Badania endoskopowe z weryfikacją histopatologiczną

Endoskopia ma podstawowe znaczenie w rozpoznawaniu i różnicowaniu, ocenie zakresu zmian i ciężkości choroby, odpowiedzi na leczenie i monitorowaniu pod kątem ognisk dysplazji nieswoistych zapaleń jelit.

W typowym obrazie endoskopowym WZJG zmiany zapalne szerzą się od odbytnicy w kierunku proksymalnym. Charakterystyczną cechą jest szerzenie się zmian w sposób

ciągły, co oznacza, że w odcinku jelita grubego objętym przez proces zapalny nie ma fragmentów prawidłowej błony śluzowej. W nieznacznie nasilonym procesie zapalnym obserwuje się zatarcie rysunku naczyniowego, obrzęk i granulowanie błony śluzowej. Wraz z postępującym nasileniem się zapalenia błona śluzowa staje się krucha, łatwo krwawi przy dotknięciu końcówką aparatu. W najcięższych przypadkach powstają nadżerki i nieregularne owrzodzenia, pseudopolipy, a przy dłuższym procesie zapalnym – zwężenie w różnych częściach jelita, najczęściej w odbytnicy [3,17,31,95,169]. Typowe zmiany histopatologiczne dla fazy aktywnej WZJG to ogniskowe nacieki granulocytarne i ropnie krypt, zwiększona liczba limfocytów i plazmocytów w blaszce właściwej błony śluzowej, przekrwienie, zmniejszenie liczby komórek kubkowych, przerwanie ciągłości nabłonka w miejscach owrzodzeń [107,171].

Swoistym objawem endoskopowym ChLC są drobne nadżerki aftowe, głębokie linijne owrzodzenia poprzeczne i podłużne, dające charakterystyczny obraz pobrukowania (objaw patognomiczny), zwężenia i przetoki. Typowe jest tzw. przeskakiwanie zmian (skip lesions), czyli odcinki prawidłowo wyglądającej błony śluzowej jelita przeplatane odcinkami zmienionej zapalnie błony śluzowej. Odbytnica najczęściej nie jest zajęta. Równie specyficzne są również ogniskowe zaburzenia krypt jelitowych oraz ziarniniaki [15,31].

Nowe metody diagnostyki endoskopowej są bardzo kosztowne i dostępne tylko w nielicznych ośrodkach w Polsce. Są to:

- endoskopia z podwójnym balonem
- wirtualna chromo endoskopia
- endoskopia fluorescencyjna (Fluorescence Endoscopy)
- optyczna tomografia koherentna (Optical coherence tomography, OCT)
- laserowa endomikroskopia konfokalna (Confocal Laser Endomicroscopy, CEM)
- bezprzewodowa endoskopia kapsułkowa (wireless capsule endoscopy, WCE) [26,29,56,78,91,102,121,133,164].

1.1.5.4. Badania obrazowe

Obowiązującym standardem oceny jelita cienkiego jest badanie kontrastowe pasażu przez jelita. Upowszechnienie endoskopii zmniejszyło potrzebę wykonywania niektórych badań radiologicznych. Mimo wielu ograniczeń (obciążenie pacjenta dużą dawką promieniowania, brak możliwości pobrania bioptatów do badania

histopatologicznego) nadal mają znaczenie następujące rodzaje badań: wlew kontrastowy doodbytniczy, zdjęcie przeglądowe jamy brzusznej, ultrasonografia, tomografia komputerowa, obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego, testy wchłaniania jelitowego (np. test obciążenia d-ksylozą). Metodą o dużej wartości diagnostycznej jest enterokliza (KT, MRI) [29,164]. Badania te poprzedza podanie dojelitowe przez sondę dodwunastniczą lub doustnie izosmotycznego kontrastu. Enterokliza umożliwia ocenę grubości ściany jelita, wykrycie powiększonych węzłów chłonnych, zmian w krezce jelitowej, obecność ewentualnych powikłań (zwężenia, ropnie, przetoki).

1.1.5.5. Diagnostyka różnicowa

Diagnostyka różnicowa WZJG (UC) i ChLC (CD) nie zawsze ma znaczenie praktyczne. Często jednak właściwe ustalone rozpoznanie determinuje dalsze postępowanie z pacjentem. Kliniczne i etiopatogenetyczne różnice między tymi jednostkami przedstawiono w tabeli 9 i 10.

Nieswoiste choroby zapalne jelit należy różnicować z następującymi jednostkami chorobowymi:

- gruźlica przewodu pokarmowego
- nowotwory przewodu pokarmowego
- zapalenie jelita krętego
- niedokrwienie jelit
- uszkodzenia po radioterapii
- rzekomoblioniaste zapalenie jelit
- zakażenia bakteryjne, pasożytnicze i wirusowe (Salmonella, Shigella, Campylobacter, Entamoeba histolytica, Yersinia enterocolitica, Clostridium difficile, rotawirus, wirus cytomegalii)
- chłoniak jelit
- ziarniniak weneryczny
- choroba uchyłkowa
- zapalenie niedokrwienne
- choroba Behçeta
- zmiany po niesteroidowych lekach przeciwzapalnych [18,95].

Tabela 9 Różnice kliniczne między WZJG (UC) i ChLC (CD) [17,21,95]

Objaw	Colitis ulcerosa	Choroba Crohna
Krwawienie	Bardzo częste	Rzadkie
Bóle brzucha	Niezbyt nasilone	Silne, częste
Wyczuwalny guz	Bardzo rzadki	Dość częsty
Przetoki	Bardzo rzadkie	Znacznie częstsze
Zajęcie odbytnicy	95%	50%
Zmiany okołodbytowe	5-18%	50-80%
Pseudopolipy	13-15%	Rzadkie
Megacolon toxicum	3-4%	Rzadko
Wolna perforacja	2-3%	Rzadko
Zwężenie jelita	Rzadkie	Częste

Tabela 10 Etiopatogenetyczne różnice między WZJG (UC) i ChLC (CD) [95]

Czynniki etiopatogenetyczne	Colitis ulcerosa (CU)	Choroba Crohna (CD)
Czynniki genetyczne	Częściowo różne od ChLC (CD)	Częściowo różne od WZJG (UC) (mutacje NOD2/CARD15)
Czynniki środowiskowe		
Palenie papierosów	Korzystne	Szkodliwe
Spożywanie monosacharydów	Bez wpływu	Szkodliwe
Związek z drobnoustrojami (Mycobacterium paratuberculosis, wirus ospy)	Nie występuje	Dość wyraźny
Czynniki immunologiczne		
Dominujący typ odpowiedzi	Humoralny	Komórkowy
Synteza przeciwciał	Wyraźnie zwiększona	Umiarkowana
Przeciwciała pANCA	Obecne w 30-80%	Obecne w 4-25%
Przeciwciała ASCA	Obecne w ok. 10%	Obecne w ok. 60%
Profil cytokin	Zależny od komórek Th2	Zależny od komórek Th1

1.1.6. Objawy pozajelitowe i powikłania NCHZJ

25-35% pacjentów z zapalnymi chorobami jelit cierpi z powodu występowania jednego lub kilku objawów pozajelitowych [101,178]. Nieswoiste choroby jelit można uważać za choroby układowe, ponieważ w ich przebiegu występują często pozajelitowe objawy, powikłania oraz inne choroby autoimmunologiczne [45]. Choroby autoimmunologiczne powiązane z nieswoistymi zapaleniami jelit można podzielić na dwie główne grupy. Pierwszą stanowią choroby związane z aktywnością zapalenia jelit, mające wspólną patogenezę: zapalenie stawów, rumień guzowaty, zapalenie tęczówek i spojówek, zgorzelinowe zapalenie skóry (pyodermia gangraenosum), pleśniakowate zapalenie jamy ustnej. Druga grupa zawiera wiele autoimmunologicznych chorób, przebiegających niezależnie od aktywności choroby jelit: zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, pierwotnie stwardniające zapalenie dróg żółciowych, pierwotna marskość żółciowa, cukrzyca typu 1, łysienie plackowate, niedokrwistość hemolityczna, choroby autoimmunologiczne tarczycy, płamica Schoenleina-Henocha, choroba Takayasu [194].

Zapalne choroby jelit są przyczyną wielu zaburzeń w homeostazie organizmu takich jak: przewlekłe zapalenie i związany z nim niedobór żelaza, reakcja ostrej fazy, aktywacja płytek, hiperkoagulopatia, odwodnienie, niedożywienie. Powoduje to występowanie wielu powikłań w ich przebiegu np.: niedokrwistość, osteopenia, zaburzenia wzrostu, kamica nerkowa, amyloidoza [45].

Objawy reumatyczne, skórne, oczne są związane głównie z zajęciem przez proces chorobowy jelita grubego, natomiast inne objawy - kamica nerkowa, kamica żółciowa, są częściej obserwowane u pacjentów, u których proces chorobowy obejmuje jelito cienkie [67].

Pozajelitowe objawy i powikłania chorób zapalnych jelit mogą dotyczyć wszystkich układów i narządów. Występowanie i nasilenie objawów dodatkowych może być niezależne od przebiegu klinicznego choroby podstawowej. U niektórych pacjentów objawy pozajelitowe mogą wystąpić jako pierwsze, wyprzedzając objawy żołądkowo-jelitowe.

Najczęstszym pozajelitowym objawem chorób zapalnych jelit są zapalne artropatie, które występują u 7-25% pacjentów [44,194]. Typy artropatii występujących u chorych na nieswoiste zapalenia jelit klasyfikuje się wg Gravallesse i Kranowitza na 3 grupy:

- zapalenia stawów obwodowych
- zapalenie stawów kręgosłupa (spondylitis)
- zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych (sacroilitis) [179,204].

Zapalenia stawów obwodowych występują częściej wśród pacjentów z ChLC (10-20%) niż u chorych z WZJG (5-10%) [136,194]. Zwykle nie powodują uszkodzeń stawów lub powodują je tylko w niewielkim stopniu. W surowicy krwi pacjentów nie wykrywa się czynnika reumatoidalnego i przeciwciał przeciwjądrowych. W przebiegu nieswoistych zapaleń jelit można wyróżnić dwa rodzaje zapalenia stawów obwodowych. Pierwszy rodzaj jest związany z aktywnością choroby podstawowej. Dotyczy mniej niż pięciu dużych stawów, szczególnie kończyn dolnych. Obrzęk występuje nagle i często samoistnie ustępuje po około 5 tygodniach; u 25-40% pacjentów może nawracać. Drugi typ zapalenia stawów obwodowych jest niezależny od aktywności choroby podstawowej i może trwać przez kilka miesięcy. Dotyczy pięciu lub więcej małych stawów i występuje zwykle symetrycznie [136]. Uważa się, że na występowanie zapaleń stawów obwodowych mają wpływ zarówno predyspozycje genetyczne, jak i bakterie zasiedlające światło jelit [135].

Kwestią dyskusyjną pozostaje częstość występowania zapalenia stawów kręgosłupa u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. Większość badań sugeruje, iż jest częstsze u chorych na ChLC, inne zaś doniesienia nie potwierdzają takiej predylekcji [23,124,125,138,204].

Obustronne, symetryczne zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych rozpoznawane na podstawie kryteriów radiologicznych towarzyszy około 4-20% przypadków chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit i najczęściej jest bezobjawowe [45,179,204].

Związek NCHZJ z występowaniem artropatii jest określanany jako podtyp spondyloartropatii seronegatywnych [9].

Wśród pacjentów z pierwotnie rozpoznany stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych (PSC - primary sclerosing cholangitis) choroby zapalne jelit, a szczególnie WZJG występują z częstością około 70-80%. 2-7% pacjentów z WZJG i 0,7-3,4% osób z ChLC ma rozpoznane pierwotnie stwardniające zapalenie dróg żółciowych [112,154]. W surowicy pacjentów z PSC w 60-78% wykrywa się nietypowe przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii (ANCA). Są one również obecne u 60-87% pacjentów z WZJG

[110,185]. Zapalne choroby jelit u pacjentów z PSC charakteryzują się szczególnymi cechami: aktywność choroby jest niska, proces chorobowy obejmuje całą okrężnicę, oszczędzając odbytnicę, występuje wsteczne zapalenie końcowego odcinka jelita krętego. Pacjenci z PSC mają 10-krotnie zwiększone ryzyko dysplazji lub przemiany nowotworowej w okrężnicy w porównaniu z populacją ogólną [22]. Stłuszczenie wątroby występuje u 30% pacjentów z zapalnymi chorobami jelit i nie zależy od rodzaju choroby ani płci. Również kamica dróg żółciowych jest częstsza wśród pacjentów z zapalnymi chorobami jelit (około 10%) w porównaniu do populacji ogólnej (7%). Jest to związane z upośledzonym wchłanianiem soli kwasów żółciowych z objętego procesem zapalnym jelita [13]. Ból brzucha i skurcze są częstym objawem organicznych chorób przewodu pokarmowego. Makharia GK zwraca uwagę, że leczenie przeciwskurczowe może być efektywne zarówno w przypadku leczenia chorób dróg żółciowych jak i w NCHZJ, zwłaszcza u osób będących w okresie remisji w przypadku łagodnego i umiarkowanego bólu przewlekłego [116]. Wiele leków stosowanych w zapalnych chorobach jelit (azatiopryna, 6-merkaptopuryna, sulfasalazyna, glikokortykosteroidy) może wywoływać ostre zapalenie trzustki, które rozpoczyna się zwykle w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia terapii, ma łagodny przebieg i szybko ustępuje po zaprzestaniu stosowania leków, które wywołały to powikłanie [175].

Wśród pacjentów z zapalnymi chorobami jelit częściej niż w populacji ogólnej występują autoimmunologiczne choroby skóry takie jak: łuszczyca, toczeń i twardzina, bielactwo, zapalenie skórno-mięśniowe [79]. Około 50% pacjentów ze zgorzeliowym zapaleniem skóry w momencie pojawienia się zmian skórnych, ma subkliniczną postać WZJG. Rumień guzowaty pojawia się u 7% pacjentów z *colitis ulcerosa*, a w ChLC nieznacznie rzadziej [200]. Szczególne znaczenie praktyczne przypisać należy rozpoznaniu i leczeniu pyoderma gangrenosum.

Objawy oczne występują u 10% pacjentów z zapalnymi chorobami jelit. Mogą one być immunozależne (zapalenie nadtwardówki, zapalenie twardówki, zapalenie naczynek) lub związane ze stosowanymi lekami (zaćma, jaskra) [44].

U 10% pacjentów z ChLC stwierdza się aftowe zapalenie jamy ustnej oraz aftopodobne owrzodzenia, przerost i zapalenie dziąseł [50]. Natomiast u pacjentów z WZJG obserwowano wygładzony i obłożony język, pobrukowanie błony śluzowej jamy ustnej

i afty [141]. Zmiany w zakresie jamy ustnej u chorych z ChLC makroskopowo są podobne do zmian stwierdzanych w jelitach podczas badania endoskopowego: owrzodzenia, brukowana błona śluzowa, obrzęk błony śluzowej oraz pseudopolipy [71,76,115,138,148,176,184]. Malins TJ i wsp. w 1991 roku jako pierwsi podjęli próbę klasyfikacji typowych dla ChLC zmian w obrębie jamy ustnej, są to:

- głębokie, przewlekłe owrzodzenia, przewlekłe afty otoczone hiperplastycznym brzegiem
- rozlany obrzęk warg, dziąseł lub policzków
- stwardniałe, polipowate zmiany przerostowe błony śluzowej w obrębie przedsionka jamy ustnej i trójkąta zatrzonowcowego
- ogniska hiperplastyczne błony śluzowej jamy ustnej, ze szczelinami tworzącymi brukowanie błony śluzowej
- ziarniniakowe zapalenie czerwieni wargowej
- zapalenie kątów warg
- pęknięcia warg w linii środkowej
- przewlekła limfadenopatia
- zapalenie języka, dziąseł, ropne, przerostowe/bujające zapalenie jamy ustnej
- rumień wokół ust [117,138].

Zwraca się uwagę na przydatność badania stomatologicznego u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. Charakterystyczne zmiany w obrębie jamy ustnej często bowiem mogą wyprzedzać pojawienie się objawów NCHZJ w ich typowym umiejscowieniu, w wielu przypadkach też towarzyszą fazie zaostrzenia choroby podstawowej.

Zapalne choroby jelit są związane z ryzykiem wystąpienia osteoporozy (2-30%) i osteopenii (40-50%) [140]. Ubytek masy kostnej i ryzyko złamań są związane z wiekiem, stosowanie glikokortykosteroidów i aktywnością choroby jelit [192]. Ponadto w patogenezie osteoporozy bierze udział wiele innych czynników, które są obecne wśród pacjentów z zapalnymi chorobami jelit takich jak: hipogonadyzm, upośledzenie wchłaniania wapnia i witaminy D oraz niskie BMI (body mass index) [62,69,197].

U pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit trzykrotnie częściej niż w grupie kontrolnej występują epizody zakrzepowe, przeważnie w postaci zakrzepicy żył głębokich i zatorowości płucnej. Zdarzają się one w młodszym wieku niż w populacji ogólnej, są częstsze w przypadkach aktywnej i powikłanej choroby podstawowej,

w ostrej fazie zaś występują inne czynniki predylekcyjne jak: unieruchomienie, zabiegi operacyjne, zakażenia [123].

Dość często obserwowana (dotyczy średnio około 30% pacjentów z NCHZJ) jest również niedokrwistość często wieloczynnikowa, najczęściej niedoborowa, bądź spowodowana nasileniem stanu zapalnego (aktywność choroby) lub będąca skutkiem stosowanej terapii (azatiopryna, 6-merkaptopuryna, metotreksat – upośledzają czynność szpiku, sulfasalazyna – zmniejszenie wchłaniania kwasu foliowego, hemoliza, aplazja szpiku) czy też chorób towarzyszących (choroby hematologiczne, choroby tkanki łącznej, przewlekła niewydolność nerek) i powikłań (rozległe resekcje jelit). Najczęściej występującymi w NCHZJ formami niedokrwistości są niedokrwistość z niedoboru żelaza, kwasu foliowego czy witaminy B12. Bezpośrednią przyczyną niedokrwistości jest jawna bądź utajona utrata krwi (najczęściej), niedobór w diecie, zaburzenia wchłaniania lub wyczerpanie endogennych magazynów. Istotnym elementem jest również tzw. niedokrwistość chorób przewlekłych (anemia of chronic disease - ACD), która jest efektem wpływu reakcji immunologicznych na erytropoezę (IFN γ , IL-1, TNF α – hamują prekursorów erytroidalnych, zaburzają metabolizm żelaza) [153,174].

Częste współistnienie zapalnych chorób jelit i chorób układu oddechowego jest najprawdopodobniej związana z podobieństwem tkanki limfoidalnej cewy pokarmowej (GALT - gut-associated lymphoid tissue) i tkanki limfoidalnej dróg oddechowych (BALM - bronchial-associated lymphoid tissue) [61]. Miąższowe choroby płuc mogą być zarówno związane z zapalnymi chorobami jelit, jak również ze stosowanymi lekami (np. salicylany). Toksyczność kwasu 5-aminosalicylowego względem płuc jest mniejsza niż sulfasalazyny [144]. Stosowanie immunosupresji może być również przyczyną oportunistycznych zakażeń [55].

Do grupy najczęściej występujących powikłań jelitowych WZJG należą: polipowatość zapalna (pseudopolipowatość) – dotyczy 13-15% chorych, ostre (toksyczne) rozdęcie okrężnicy (megacolon toxicum) – 3-4% chorych, perforacja okrężnicy, masywny krotok z jelita grubego, zwężenie jelita grubego oraz najpoważniejszy odległy skutek – rak jelita grubego [18]. Zarówno występowanie objawów pozajelitowych jak i powikłań jelitowych u chorych z NCHZJ może wpływać na jakość życia i zdolność do pracy, jak również zwiększać liczbę hospitalizacji.

1.1.7. Klasyfikacja NCHZJ

Celem określenia aktywności choroby jak i monitorowania efektów terapeutycznych stosuje się u dorosłych obliczanie wskaźnika aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (CAI), którego składowe oraz metodę obliczania zawarto w tabelach 4, 5 i 6.

1.1.7.1. Klasyfikacja montrealaska i wskaźnik aktywności – CDAI choroby Leśniowskiego-Crohna

Tabela 4 Klasyfikacja montrealaska choroby Leśniowskiego-Crohna [21]

A	wiek w chwili rozpoznania	L	lokalizacja	B	przebieg
A1	do 16 r. ż.	L1	jelito kręte	B1	bez zwężeń i przetok
A2	< 40 r. ż.	L2	okreźnica	B2	ze zwężeniami
A3	> 40 r. ż.	L3	jelito kręte i okreźnica	B3	z przetokami
		L4	izolowany gopp (górnny odcinek przewodu pokarmowego) (L4 może być dodany do L1-L3)	p	zmiany okołodbytowe (może być dodawany do B1-B3)

Tabela 5 Metoda obliczania wskaźnika CDAI

Objaw	Mnożnik	Wartość
Liczba luźnych/płynnych stolców / tydzień	x 2	
Bóle brzucha, suma z 7dni, nasilenie w skali 0-3	x 5	
Samopoczucie w skali 0-4 (=bardzo złe) / tydzień	x 7	
Objawy dodatkowe i powikłania: 1 za każdy	x 20	
Leki antyprystaltyczne: 0 (=nie)-1(=tak)	x 30	
Guz w jamie brzusznej: 0(=nie)-2(=wątpliwy)-5(=tak)	x 10	
Hematokryt (Hct): Kobiety (42-Hct) Mężczyźni (47-Hct)	x 6	
Masa ciała (% poniżej masy należnej)	x 1	
SUMA		

Tabela 6 Aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna na podstawie wartości wskaźnika CDAI

Wartość wskaźnika CDAI	Aktywność choroby
< 150	Remisja
150 - 220	Mała aktywność
220 - 450	Średnia aktywność
> 450	Duża aktywność

Według Światowej Organizacji Gastroenterologii (ang. World Gastroenterology Organization – WGO, 2010 rok) warunkiem koniecznym, by prawidłowo rozpoznać ChLC konieczne jest spełnienie następujących kryteriów:

- zmiany nieciągłe lub odcnikowe obecne w badaniach radiologicznych, endoskopowych, preparacie chirurgicznym
- „brukowanie” błony śluzowej lub podłużne owrzodzenia obecne w badaniach radiologicznych, endoskopowych, preparacie chirurgicznym
- zapalenie pełnościenne – kryteria kliniczne, radiologiczne, biopsja, preparat chirurgiczny
- nieserowaciejące ziarniniaki – biopsja, preparat chirurgiczny
- szczeliny, przetoki – kryteria kliniczne, radiologiczne, preparat chirurgiczny
- zmiany okołodbytowe – kryteria kliniczne [18,24].

1.1.7.2. Klasyfikacja i wskaźniki aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

W 2005 roku na Światowym Kongresie Gastroenterologii w Monteralu zaproponowano klasyfikację colitis ulcerosa opartą na dwóch kryteriach:

- rozległości zmian w jelicie grubym
- ciężkości rzutu (zaostrenia) choroby [163].

Te powszechnie przyjęte dane te przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7 Klasyfikacja montrealaska wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [21]

Symbol	Zasięg zmian	Opis zmian
E1	Zapalenie odbytnicy	Zmiany ograniczone do odbytnicy
E2	Zapalenie lewej połowy okrężnicy	Zmiany położone dystalnie do zagięcia śledzionowego
E3	Rozległe zapalenie okrężnicy	Zmiany położone proksymalnie do zagięcia śledzionowego

Symbol	Ciężkość zaostrzenia	Opis objawów
S0	Remisja	Postać bezobjawowa
S1	Łagodne	Do 4 stolców na dobę z krwią lub bez krwi, bez objawów ogólnych, OB w normie
S2	Umiarkowane	Ponad 4 stolce na dobę z krwią, miernie nasilone objawy ogólne
S3	Ciężkie	6 lub więcej stolców na dobę, tętno >90/min, ciepłota $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$, poziom hemoglobiny w surowicy krwi <10.5g%, OB $\geq 30\text{mm/godz}$

Prosty sposób oceny aktywności WZJG opracowany przez Rachmilewita, uwzględniający liczbę wypróżnień, obecność krwi w stolcu, stan ogólny, bóle brzucha, temperaturę ciała, objawy pozajelitowe, wartość OB oraz hemoglobiny, przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8 Sposób wyznaczania wskaźnika Rachmilewita – CAI

Kryterium	Liczba punktów
Liczba stolców w tygodniu	
< 18	0
18 - 35	1
36 - 60	2
> 60	3
Obecność krwi w stolcu, średnio	

Brak	0
Mała ilość; < 30% krwistych stolców	2
Duża ilość; > 30% krwistych stolców	4
Stan ogólny	
Dobry	0
Średni	1
Zły	2
Bardzo zły	3
Bóle brzucha	
Brak	0
Łagodne	1
Umiarkowane	2
Silne	3
Temperatura spowodowana zapaleniem jelit	
37 - 38 °C	0
> 38 °C	3
Objawy pozajelitowe	
Zapalenie tęczy	3
Rumień guzowaty	3
Zapalenie stawów	3
Wyniki badań laboratoryjnych	
OB > 50mm/godz	1
OB > 100mm/godz	2
Hb < 10g%	4
Suma	

1.1.8. Leczenie NCHZJ

Odkąd zidentyfikowano zapalne choroby jelit w oparciu o objawy kliniczne, liczne grupy badaczy usiłowały określić procesy patofizjologiczne wywołujące te schorzenia, a lekarze - znaleźć skuteczną terapię zwalczającą objawy kliniczne. Wieloletnie doświadczenia doprowadziły do wysnucia wniosku, że choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego są różnymi jednostkami chorobowymi. Jednakże to, czy są to całkowicie odmienne schorzenia, nadal pozostaje pytaniem bez odpowiedzi.

1.1.8.1. Leczenie farmakologiczne NCHZJ

W terapii obu schorzeń stosuje się głównie leczenie objawowe, ze względu na niepełną znajomość mechanizmów leżących u podstaw nieswoistych zapalnych chorób jelit, mimo iż w ostatniej dekadzie zrozumienie etiologii i patogenezы tej grupy schorzeń uległo znacznej poprawie. Niedawny rozwój biologicznych metod leczenia oraz wykorzystywanie środków immunomodulujących w NCHZJ, pozwoliły na znaczącą kontrolę zapalenia i owrzodzeń w błonie śluzowej. Stanowią one potencjalną możliwość modyfikacji przebiegu choroby: zapobiegania powikłaniom i zmniejszenie częstości i rozległości ewentualnych zabiegów operacyjnych. Nie zidentyfikowano niestety niezawodnych, czułych i swoistych markerów pozwalających przewidzieć przebieg choroby czy zidentyfikować pacjentów, u których wczesne zastosowanie terapii biologicznej mogłoby przynieść wymierne korzyści w postaci zapobiegania w przyszłości komplikacjom i zabiegom chirurgicznym. Tak więc optymalnym rozwiązaniem pozostaje nadal różnorodne i zindywidualizowane podejście do każdego pacjenta, gdzie główne cele terapeutyczne są następujące:

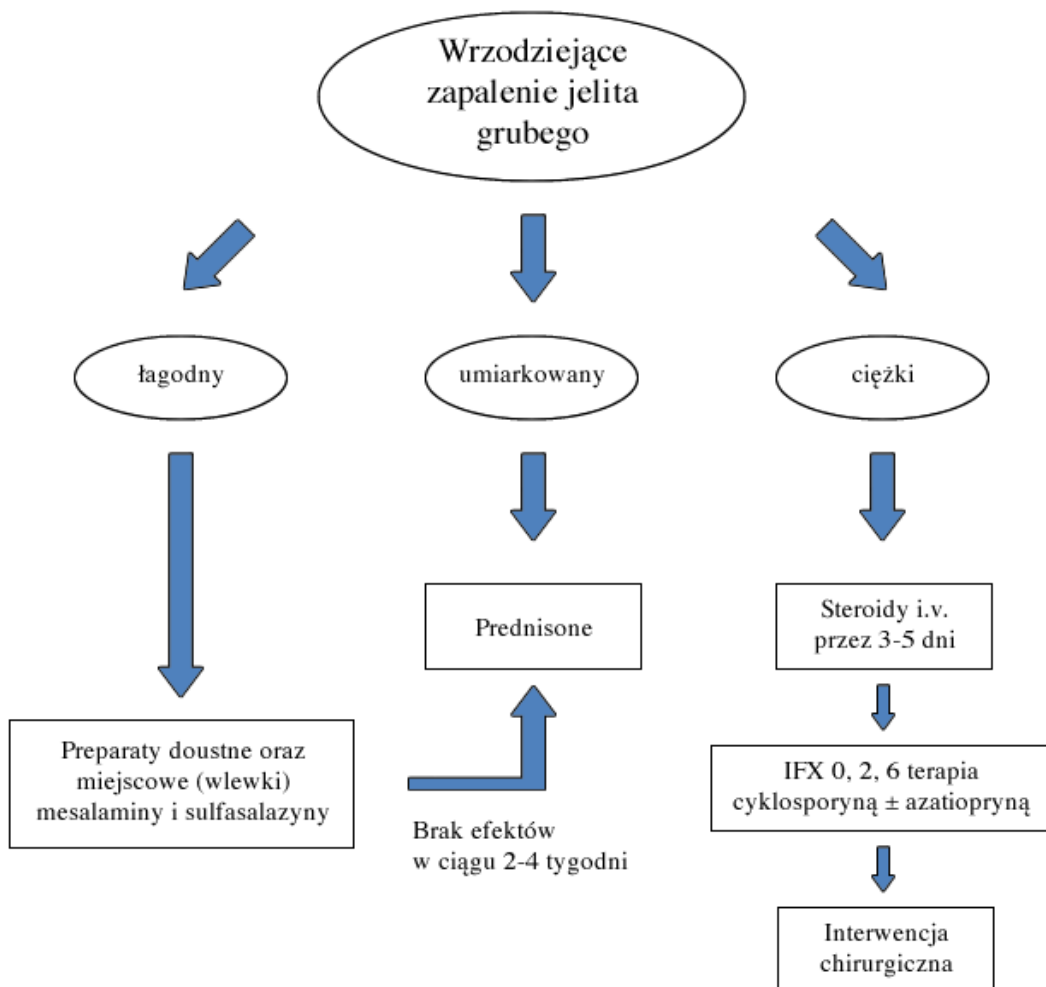
- poprawa jakości życia pacjentów (indukcja i utrzymanie remisji)
- przewidywanie, zapobieganie bądź leczenie powikłań
- zapobieganie, leczenie niedoborów żywieniowych oraz utrzymanie optymalnego stanu odżywienia pacjenta
- wsparcie psychologiczne [170].

Poszczególne cele możemy osiągnąć z wykorzystaniem następujących środków terapeutycznych: 5-aminosalicylanów, kortykosteroidów, leków immunosupresyjnych, antybiotyków, substancji odżywczych oraz czynników biologicznych. Indywidualny plan leczenia pacjenta oraz właściwe korzystanie z dostępnych środków terapeutycznych, powinny uwzględniać: wiek w momencie rozpoznania choroby, płeć,

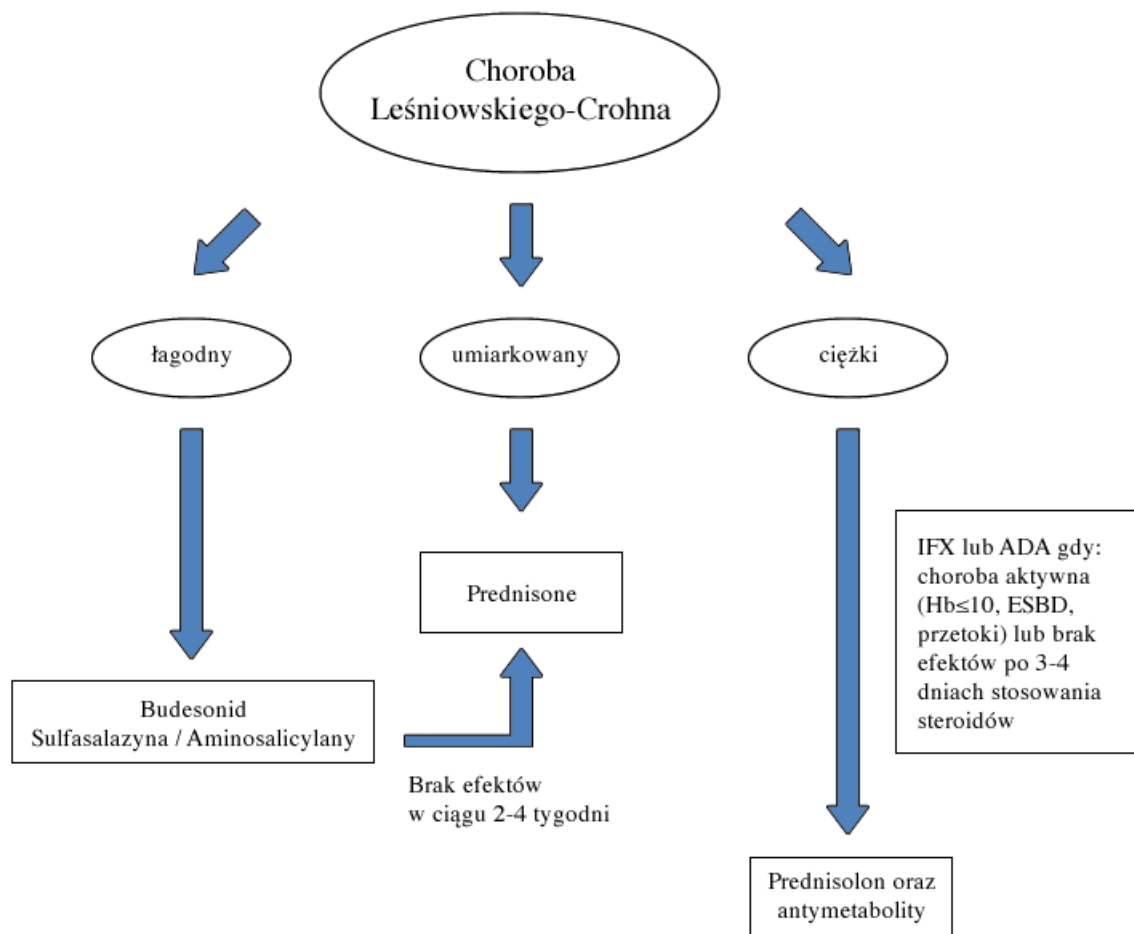
rasę, sposób prezentacji i lokalizacji choroby, powikłania oraz serologiczne markery genetyczne. Czynniki te przyczyniają się do ustalenia wyboru wariantu terapii – *step up* czy *top down*, stosowanie monoterapii czy terapii skojarzonej z lekami biologicznymi i immunomodulującymi [170].

W pracy na rycinie 1 przedstawiono model farmakoterapii WZJG a na rycinie 2 zalecenia terapeutyczne dla choroby Leśniowskiego-Crohna.

Rycina 1 Schemat leczenia WZJG [139,181]



Rycina 2 Schemat leczenia ChLC [139,181]



W leczeniu farmakologicznym nieswoistych zapalnych chorób jelit kluczową rolę odgrywiają kortykosteroidy. Preferowany jest prednizolon podawany doustnie, doodbytniczo lub pozajelitowo. Leki z tej grupy są stosowane w indukcji remisji od ponad pół wieku. Mogą być stosowane samodzielnie lub w połączeniu z preparatami mesalazyny celem utrzymania remisji choroby. Odpowiedź na terapię steroidową u poszczególnych pacjentów z NCHZJ (IBD) pozwala podzielić ich na trzy grupy: pacjentów wrażliwych na terapię steroidami (steroid-responsive) - 40% pacjentów, pacjentów ze steroidozależnością (steroid-dependent) - 30-40% pacjentów, oraz pacjentów niereagujących na steroidy (steroid-resistant) - 15-20% pacjentów. Długotrwałe stosowanie glikokortykosteroidów związane jest z występowaniem wielu efektów ubocznych oraz zjawiskiem steroidooporności. Częstość występowania działań niepożądanych wydaje się zwiększać, gdy dawki prednizolonu są wyższe niż 40mg/dobę. W związku z powyższym w ciężkich postaciach choroby Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego stosuje się terapię złożoną.

W wielośrodkowym badaniu D'Haens G i wsp. udowodnili, że terapia łącząca metylprednizolon z lekami immunosupresyjnymi jest bardziej efektywna w uzyskiwaniu i podtrzymywaniu remisji niż terapia tradycyjna [39,147].

Od początku lat 80-tych XX wieku w terapii NCHZJ zaczęto stosować pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (mesalazyna, sulfasalazyna). Różnice w postaci i formie podania preparatów 5-ASA mogą znacząco wpływać na skuteczność leczenia, tolerancję leku oraz przestrzeganie zaleceń przez pacjenta. Ponad 60% pacjentów nie przyjmuje preparatów 5-ASA zgodnie z zaleceniem, narażając się tym samym na 5-krotnie większe ryzyko nawrotu choroby. W związku z powyższym ogromny nacisk kładzie się w chwili obecnej na opracowywanie nowych formuł leków z tej grupy. I tak odpowiednio pojawiły się między innymi: MMX (multi-matrix-mesalazine) - wysokodawkowe tabletki zawierające 1,2g mesalazyny, pokryte filmem polimerowym opornym na pH żołądka (Asacol 800mg, Pentasa 2,0g). Postacią, z którą wiąże się duże nadzieje terapeutyczne są mini granulki (Micropellets – Pentasa, Micropellets – Salofalk). Liczne badania kliniczne wykazały, że minigranulki są tak samo skuteczne jak tabletki, lecz zredukowana częstość przyjmowania preparatu znacząco wpłynęła na przestrzeganie zaleceń przez pacjentów. Kolejną nową formą preparatu 5-ASA są czopki (Salofalk 3g oraz Claversal 0,5g), które wykazują szczególną skuteczność działania u pacjentów ze zmianami chorobowymi zlokalizowanymi w końcowym odcinku jelita grubego. Ogromne nadzieje wiąże się z ujawnieniem powinowactwa preparatów 5-ASA do receptorów PPAR- γ (peroxisome proliferator – activated receptors- γ), które ulegają ekspresji na komórkach nabłonkowych okrężnicy [128,181]. Bassaganya-Riera J i wsp. przy użyciu modelu mysiego przeprowadzili badanie mające na celu zbadanie komórkowych i molekularnych mechanizmów leżących u podstaw skuteczności działania przeciwwzapalnego bakterii probiotycznych w jelitach. Wykazali, że bakterie probiotyczne modulują różnorodność mikroorganizmów i sprzyjają lokalnej produkcji sprzężonego kwasu linolenowego (CLA – cis-linoleic acid, wielonienasycony kwas tłuszczowy typu omega-6, z silnym efektem przeciwwzapalnym) w okrężnicy, skierowane poprzez szpikowy receptor PPAR- γ tłumi zapalenie jelita grubego [19]. Mimo różnorodności postaci preparatów 5-ASA i wynikających z tego korzyści w leczeniu NCHZJ, należy jednak pamiętać o możliwych niepożądanych efektach ich stosowania. U 10-45% pacjentów z WZJG, u których stosuje się preparaty sulfasalazyny występują m.in. bóle głowy, nudności, zmęczenie, które mogą być

zminimalizowane poprzez podawanie leków podczas posiłków bądź poprzez zmniejszenie ich dawki. Kolejnymi rzadziej występującymi skutkami ubocznymi są: reakcje alergiczne, wysypka, zespół Stevens-Johnsona, zapalenie płuc, niedokrwistość hemolityczna, odwracalne zmniejszenie liczby i ruchliwości plemników nie wpływające na płodność. Znany jest również hamujący wpływ na jelitowe wchłanianie kwasu foliowego. Nowsze preparaty mesalazyny są z reguły lepiej tolerowane, a działania niepożądane stosunkowo rzadkie i niewielkie. Zarówno sulfasalazyna jak i jej metabolity przenikają przez łożysko, ale nie wykazano możliwości uszkodzenia płodu, mogą być więc bezpiecznie stosowane w ciąży [147,181].

1.1.8.2. Leczenie biologiczne w przebiegu NCHZJ

Istotną rolę w rozwoju choroby Leśniowskiego-Crohna przypisuje się niekontrolowanej aktywacji układu odpornościowego. Z tego względu limfocyty, cytokiny i molekuly adhezji stały się obecnie głównym celem interwencji terapeutycznej. Celem indukcji remisji oraz modyfikacji przebiegu nieswoistych chorób jelit zaczęto powszechnie stosować leczenie biologiczne. Przeznaczeniem uzyskiwanych metodą inżynierii genetycznej preparatów jest unieczynnienie poszczególnych składowych układu odpornościowego.

Obiecujące wydają się być doniesienia dotyczące antagonistów TNF i blokerów α -4-integryny (Natalizumab), chociaż bezpieczeństwo stosowania i skuteczność nowych form terapii wymagają przeprowadzenia dalszych badań [128].

W ciągu ostatnich 10 lat infliximab - czynnik anty-TNF- α - stał się podstawą leczenia wielu chorób autoimmunologicznych, przynosząc również korzyści terapeutyczne u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Infliximab indukuje i podtrzymuje remisję oraz zamykanie się przetok. Lek ten nie jest skuteczny u wszystkich pacjentów. Około 1/3 pacjentów nie odnosi żadnej korzyści z jego stosowania, a kolejna 1/3 chorych wykazuje wyłącznie częściową odpowiedź. Dlatego niezbędnym stało się poszukiwanie nowych preparatów terapii biologicznej. Nowszej generacji leki anty-TNF- α jak pegylowany certolizumab czy Adalimumab wykazują skuteczność zbliżoną do Infliximabu i stanowią alternatywę dla pacjentów, którzy nabyli oporność na Infliximab lub źle go tolerują. Obiecująca wydaje się być terapia mająca na celu zablokowanie funkcji komórek T, unieszkodliwienie linii komórek T produkującej cytokiny prozapalne lub indukcję apoptozy poszczególnych

podtypów komórek T. Limfocyty T CD4⁺ rozpoznają prezentowany im antygen i prezentują go w połączeniu z cząsteczką MHC II aby wywołać odpowiedź immunologiczną. Po odkryciu antagonistów komórek CD4⁺ takich jak cM-T412 stworzono przeciwciała przeciw swoistym podtypom komórek T: CD3⁺ (Visilizumab) i CD25⁺ (Daclizumab i Basiliximab). Visilizumab indukuje apoptozę wybiórczo w aktywowanych komórkach T i jest skuteczniejszy niż mysie przeciwciała monoklonalne anti-CD3. Daclizumab i Basiliximab wykazują aktywność zbliżoną do cyklosporyny. Dodatkowo, jako, że IL-2 indukuje oporność na steroidy, blokada tego receptora powinna skutkować ominięciem oporności [146]. Mechanizm działania wybranych leków biologicznych przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11 Mechanizm działania wybranych leków biologicznych [28,146]

Mechanizm działania	Składnik	Cel
Blokowanie limfocytów T	Cm-T412	CD4
	Visilizumab	CD3
Blokowanie różnicowania i aktywacji limfocytów T	Abatacept	CD28
	Tocilizumab	Receptor dla IL6
Eliminacja własnych komórek T	Przeszczep komórek hemopoetycznych szpiku	Autologiczne komórki hemopoetyczne szpiku
Anty - TNF	Thalidomid	Działanie przeciwzapalne i zapobiegające neowaskularyzacji
Modulacja regulatorowych limfocytów T	IL10	IL10
Blokowanie rekrutacji komórek	Natalizumab	Leukocyt $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$, integryny
Przyspieszenie naprawy	Somatotropina	Nabłonek jelitowy
Stymulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej	Sargramostim	Nabłonek jelitowy, neutrofile, monocyty
	Filgastrim	Neutrofile

Certolizumab – trzeci czynnik anti-TNF- α zaaprobowany do stosowania przez FDA (Food and Drug Administration) okazał się być skuteczny również u pacjentów opornych na Infliximab. W metaanalizie Shao LM i wsp. (1 040 chorych), wykazano

skuteczność pegylowanego Certolizumabu w szybkiej indukcji remisji oraz długoterminową skuteczność w podtrzymywaniu remisji u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna [168].

Przeciwwskazania względne i/lub bezwzględne do stosowania terapii antagonistami TNF- α układają się w akronim **STOIC**: **S**epsis (posocznica), **T**uberculosis (gruźlica), **O**ptic neuritis (zapalenie nerwu wzrokowego), **I**nfusion reaction (objawy niepożądane), **C**ancer (nowotwór) [37].

W 1991 roku stwierdzono, że talidomid hamuje syntezę cytokin, czynnik martwicy nowotworów- α (TNF α) poprzez przyspieszanie degradacji mRNA [36,159]. Talidomid zwiększa poziom IFN- γ i moduluje wiele innych cytokin, zwłaszcza interleukinę 2 (IL-2) oraz interleukinę 12 (IL-12) [106]. Zainteresowanie tym lekiem wzrosło w ostatnich latach głównie ze względu na właściwości immunomodulujące i antyangiogenne talidomidu [35,36,38,47,48].

Szereg badań klinicznych wykazało skuteczność terapii talidomidem w leczeniu wielu stanów klinicznych, takich jak: wirus HIV i związany z nim zespół wyniszczenia [36,89], dziedziczne teleangiektazje krwotoczne [36,105], zmiany skórne w toczeniu układowym [34,36], szpiczak mnogi [36,191], choroba Behceta [36,46].

Cui-Fang Zheng i wsp. oceniali skuteczność i tolerancję talidomidu u sześciorga dzieci z oporną na leczenie chorobą Leśniowskiego-Crohna. W przeprowadzonym badaniu uzyskano remisję choroby po 3 miesiącach stosowania preparatu, wyrażającą się poprawą stanu klinicznego pacjentów jak również poprawą w obrazie endoskopowym jelita [36].

Leite MR i wsp. opisali przypadek 24-letniego mężczyzny z postacią oporną na leczenie sterydami chorobą Leśniowskiego-Crohna, u którego zastosowano w przeszłości leczenie preparatami biologicznymi (infliximab). U pacjenta uzyskano całkowitą remisję choroby po zastosowaniu 6-cio miesięcznej kuracji talidomidem [106].

Szereg przypadków chorych z ciężką postacią choroby Leśniowskiego-Crohna, oporną na działanie środków konwencjonalnych i biologicznych, gdzie zastosowano talidomid uzyskując całkowitą remisję choroby zostało opisanych w doniesieniach m.in. Ehrenpreis ED i wsp., Vasiliasukas EA i wsp., Bariol C i wsp., Kane S i wsp. [14,54,87,106,193].

Większość leków stosowanych w terapii NCHZJ można stosować bezpiecznie w czasie ciąży, wyjątek stanowią metotrexat i talidomid (właściwości anty-TNF α). Jednakże u kobiet w wieku reprodukcyjnym powinno się unikać stosowania tych leków ze względu na ich terato- i mutagenność. Nie stwierdzono, aby leki te stosowane w leczeniu NCHZJ wpływały niekorzystnie na płodność u kobiet [83,98].

Obecnie prowadzone są również badania nad wykorzystaniem alternatywnych form leczenia przeciwzapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit, spośród których na uwagę zasługują: kwasy tłuszczowe omega-3 i leukocytoafereza.

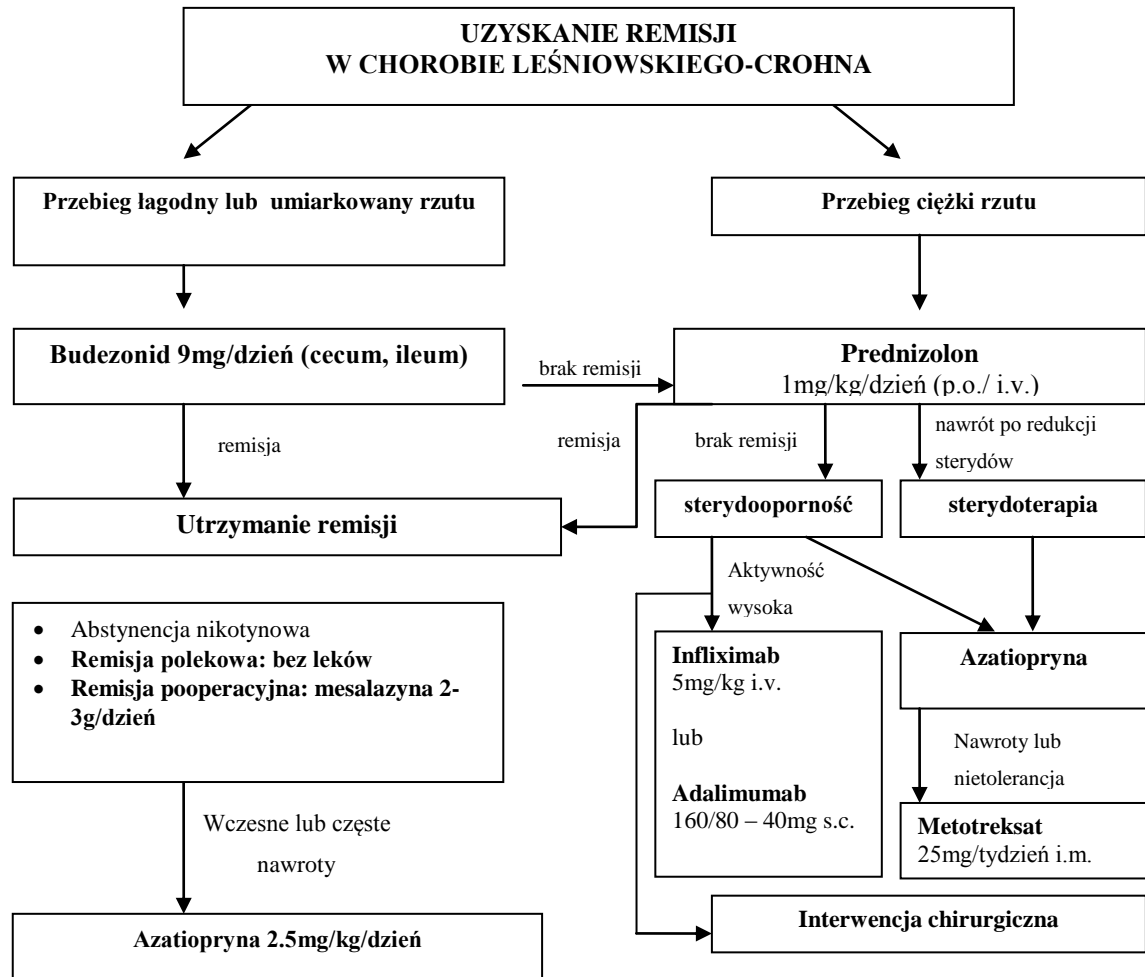
W fazie badań pilotażowych jest zastosowanie pasożytów przewodu pokarmowego w chorobie Leśnowskiego-Crohna. Stwierdzono złagodzenie objawów choroby u pacjentów, których poddano kolonizacji jajami *Trichuris suis* (włosogłówka świńska). Prawdopodobny jest mechanizm działania poprzez zmniejszenie stanu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznej organizmu [1].

Według teorii sugerującej, że u podłoża NCHZJ leży dysbioza czyli załamanie równowagi między gatunkami bakterii działającymi ochronnie na jelito a gatunkami wykazującymi działanie szkodliwe, próbuje się wykorzystywać w leczeniu probiotyki. Według najnowszych danych, zwraca się również uwagę na potencjalnie istotną rolę adherentnej inwazyjnej *Escherichia coli* w inicjacji i podtrzymywaniu stanu zapalnego. Niemniej wiedza na temat flory bakteryjnej jelita jest nadal niepełna i wymaga kontynuacji celem analizy tzw. mikrobiomu [146].

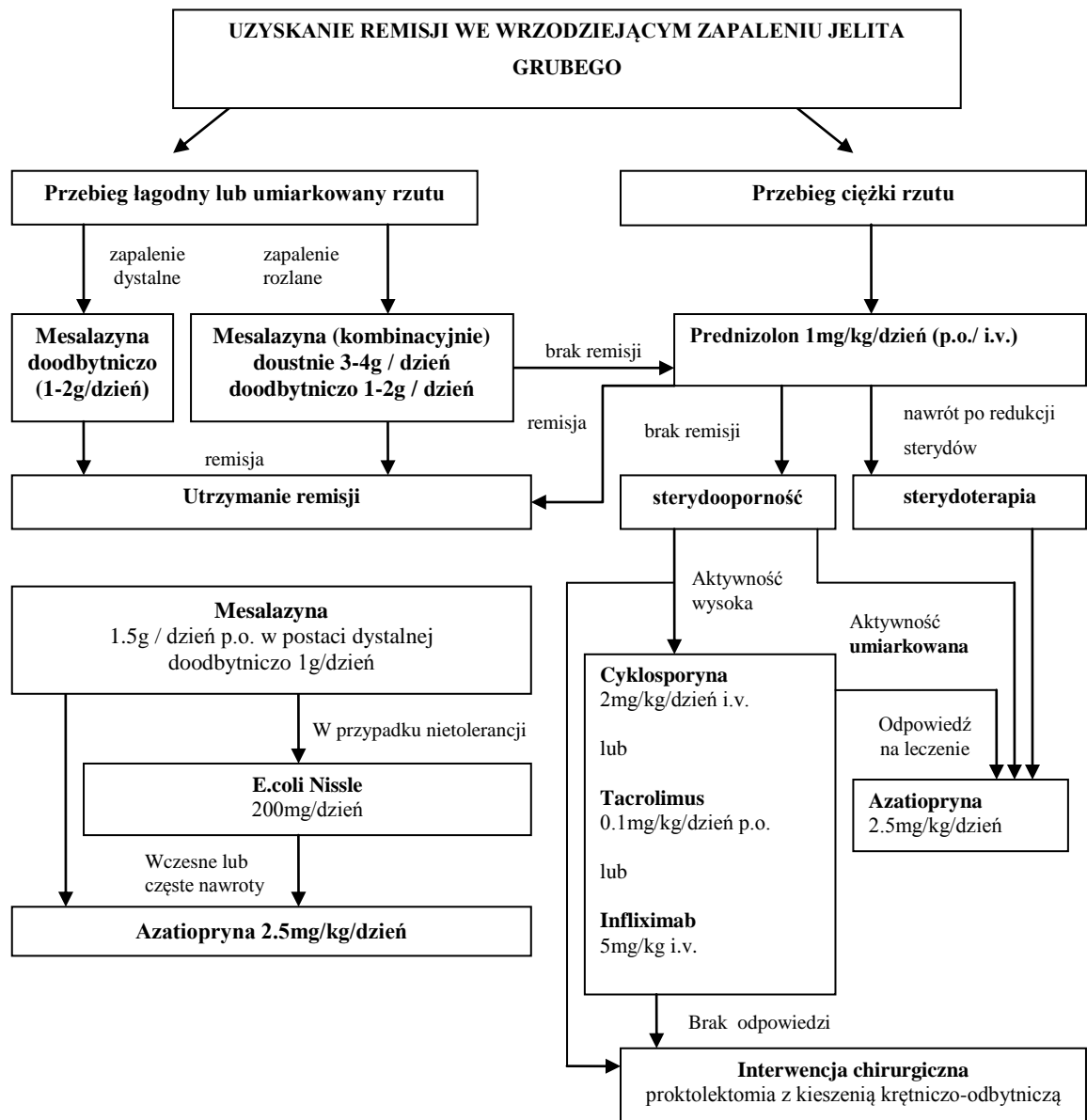
Terapia biologiczna zajmuje aktualnie istotne miejsce w algorytmach leczenia NCHZJ. Aktualne dane sugerują, iż jej powszechne zastosowanie jest ograniczone przez konieczność podawania pozajelitowego, względy ekonomiczne oraz wysoką immunogenność preparatów. Nadal niesatysfakcjonujące efekty terapii konwencjonalnej prowadzą do zintensyfikowania badań nad alternatywnymi metodami leczenia NCHZJ (IBD), jednak rolę pierwszoplanową odgrywa poszukiwanie leczenia przyczynowego. Należy pamiętać, że wprowadzenie terapii biologicznej mimo znacznego rozszerzenia spektrum leczenia NCHZJ (IBD), niesie za sobą również nowe zagrożenia i z tego powodu, pacjenci poddani tego rodzaju terapii powinni być monitorowani przez doświadczonych specjalistów w ścisłej współpracy interdyscyplinarnej lekarzy różnych specjalności.

W ostatnich latach odnotowano znaczny postęp w zrozumieniu etiologii i patogenezы NCHZJ, jako główny cel terapeutyczny wyznaczono uzyskanie i utrzymanie remisji. Aktualne strategie terapeutyczne w uzyskaniu remisji przedstawiono na poniższych rycinach (rycina 3 i 4).

Rycina 3 Uzyskanie remisji w chorobie Crohna [188]



Rycina 4 Uzyskanie remisji we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [187]



1.1.8.3. Rola leczenia chirurgicznego w NCHZJ

Wskazania do operacji nieswoistych zapaleń jelit można podzielić na pilne oraz wybiórcze.

Leczenie chirurgiczne w ChLC:

Pilne:

- ostre powikłania brzuszne (całkowita niedrożność wskutek zwężenia jelita cienkiego, perforacja z rozlanym zapaleniem otrzewnej, masywny krwotok)
- brak wyraźnej poprawy w ciągu 7-10dni od rozpoczęcia intensywnego leczenia zachowawczego ciężkiego rzutu choroby.

Wybiórcze:

- przetoki wewnętrzne, przetoki zewnętrzne
- septyczne powikłania śródbrzusze
- rozległe zmiany okołodbytowe
- stwierdzenie lub podejrzenie raka
- przewlekłe inwalidztwo mimo prawidłowego leczenia zachowawczego
- opóźnienie rozwoju fizycznego i zahamowaniem wzrostu u dzieci [17,57].

Operacją z wyboru w przypadku ChLC jest oszczędna resekcja. Zamiast resekcji wykonuje się również śródoperacyjne rozszerzanie zwężeń jelita cienkiego (ang. strictureplasty). Jeśli proces chorobowy dotyczy zajęcia prawej lub lewej połowy okrężnicy wykonuje się hemikolektomię. Przy rozległych zmianach wymagane jest wykonanie kolektomii z zespoleniem krętniczo-odbytniczym lub proktokolektomii z wytworzeniem stałej ileostomii [17]. Interesujące wydają się obserwacje szwedzkich autorów, którzy badając grupę 212 218 pacjentów po appendektomii z powodu ostrego zapalenia wyrostka robaczkowego, wykazali większą częstość występowania ChLC w porównaniu z osobami nieoperowanymi. Istotnie wyższe ryzyko obserwowano u chorych z perforowanym zapaleniem wyrostka robaczkowego, u których również choroba miała cięższy przebieg. Autorzy nie sugerują, że sama operacja może sprzyjać wystąpieniu choroby, jednak nie wykluczają związków przyczynowych pomiędzy tymi chorobami [5,100].

Wskazania do leczenia chirurgicznego w WZJG:

Pilne:

- ostre toksyczne rozdęcie okrężnicy (megacolon toxicum)
- przedziurawienie okrężnicy
- masywny krwotok jelitowy
- ciężki rzut *colitis ulcerosa* nie poddający się 7-10-dniowemu intensywnemu leczeniu glukokortykosteroidami lub 5-7-dniowemu leczeniu cyklosporyną dożylnie.

Wybiórcze:

- utrzymywanie się objawów pomimo optymalnego leczenia zachowawczego
- rak lub zmiany przedrakowe w jelicie grubym
- zahamowanie wzrostu, opóźnienie dojrzewania płciowego u dzieci
- powikłania długotrwałej kortykoterapii
- niektóre powikłania miejscowe (przetoka odbytniczo-pochwowa, zwężenie okrężnicy)
- wyjątkowo powikłania pozajelitowe (zgorzelinowe zapalenie skóry - pyodermia gangraenosum, postępujące choroby miększu wątroby) [17].

W leczeniu chirurgicznym *colitis ulcerosa* operacją z wyboru jest całkowite wycięcie odbytnicy i okrężnicy (proctocolectomia) z wytworzeniem odbytu na jelicie krętym (ileostomia). Innym rodzajem stosowanych zabiegów chirurgicznych jest usunięcie samej okrężnicy i zespolenie jelita krętego z odbytnicą, co pozwala na uniknięcie sztucznego odbytu. Najczęściej wykonywaną operacją jest obecnie operacja typu „pouch”, która polega na proctokolektomii z wytworzeniem zbiornika z końcowego odcinka jelita krętego i zespoleniu go z kanałem odbytu [17]. Ten rodzaj zabiegu chirurgicznego w badaniach retrospektywnych Zmora O i wsp. okazał się bezpiecznym zabiegiem u pacjentów z MUC (mucosal ulcerative colitis) leczonych preparatami immunosupresyjnymi [205].

2. Cel i założenia pracy

Celem przeprowadzonych badań były:

1. Ocena profilu wybranych cytokin Th1 i Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ) w zależności od intensywności procesu chorobowego, który oceniano za pomocą wskaźników zapalnych, klinicznego stopnia nasilenia choroby.
2. Określenie odsetka limfocytów T regulatorowych (CD3+CD4+ CD25+) w surowicy krwi obwodowej chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna.
3. Ocena stanu odżywienia pacjentów z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit.

Nieswoiste zapalenia jelit związane są z aktywną reakcją immunologiczną regulowaną przez cytokiny. Zjawisko dewiacji immunologicznej, w której przeważa odpowiedź typu Th1 lub Th2, z pewnością wpływa na rozwój nieswoistych chorób zapalnych. Równoczesny pomiar cytokin Th1 i Th2 powinien dać wgląd w procesy immunologiczne zachodzące w organizmie.

3. Materiał i metody

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała Nr 327/09).

Do badania została zakwalifikowana grupa 51 osób. Badaniu zostali poddani pacjenci hospitalizowani w Katedrze Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki oraz Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badania zostali poinformowani o celach i przebiegu badania oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

Badaniami byli objęci pacjenci obu płci z NCHZJ potwierdzoną badaniem histopatologicznym. Przeprowadzono następujące badania dodatkowe: badanie podmiotowe, badanie przedmiotowe, badania biochemiczne, badania radiologiczne (według wskazań), skala CDAI, skala CAI. Grupę kontrolną (n=15) stanowili zdrowi wolontariusze z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu.

Z badania wykluczono pacjentów:

- w wieku poniżej 18 roku życia
- z niewydolnością nerek, wątroby, hiperbilirubinemią, zapaleniem trzustki, zaburzeniami hormonalnymi, chorobami alergicznymi
- przyjmujących leki neuroleptyczne, przeciwdepresyjne.

3.1. Charakterystyka grupy badanej

U każdego pacjenta przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe. Brano pod uwagę wywiad rodzinny, choroby przebyte i współistniejące istotne z punktu widzenia klinicznego, przebyte zabiegi operacyjne oraz ich zasięg, początek, czas trwania i przebieg choroby podstawowej, aktualną aktywność choroby, ewentualne powikłania, aktualnie zgłaszane przez pacjenta objawy, w szczególności: ból brzucha, charakter, częstotliwość wypróżnień, krwawienie z odbytu, nagłe parcie na stolec, występowanie epizodów nietrzymania stolca. Istotnym również było zdobycie informacji na temat leczenia stosowanego w przeszłości i w czasie bieżącej hospitalizacji.

W badaniu przedmiotowym oceniano napięcie, ucieplenie i wilgotność skóry, obecność obrzęków obwodowych oraz blizn pooperacyjnych i przetok na skórze brzucha, napięcie powłok, obronę mięśniową oraz obecność oporów patologicznych w zakresie

jamy brzusznej, tkliwość w badaniu palpacyjnym, perystaltykę, wielkość wątroby i śledziony, a także czynność układu krążenia (częstość akcji serca, ciśnienie tętnicze).

U wszystkich pacjentów wykonano badania laboratoryjne: morfologię krwi z rozmazem obwodowym, wykładniki stanu zapalnego: OB, stężenie CRP oraz badanie układu krzepnięcia (liczba płytek krwi, wskaźnik protrombinowy, stężenie fibrynogenu, APTT), stężenie bilirubiny całkowitej, mocznika, kreatyniny, hormonu tyreotropowego, aktywność aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej, γ glutamylotransferazy, amylazy i lipazy w surowicy, proteinogram, stężenie białka, albuminy, cholesterolu całkowitego, HDL, LDL, triglicerydów, glikemia na czczo, badanie ogólne moczu, badanie kału: ogólne, bakteriologiczne, parazytologiczne. U wszystkich pacjentów wykonano również badanie USG jamy brzusznej. W znacznej większości w czasie hospitalizacji wykonano badanie endoskopowe dolnego odcinka przewodu pokarmowego, wlew kontrastowy lub pasaż jelitowy w zależności od wskazań.

Został również przeprowadzony szczegółowy wywiad z pacjentami odnośnie ich aktualnego stanu zdrowia, kondycji psychicznej, czasu i podstawy rozpoznania choroby, przebytych zabiegów operacyjnych i ich zasięgu oraz zajętego przez proces chorobowy odcinka przewodu pokarmowego. Każdy pacjent został poddany badaniu przedmiotowemu. Wyniki zostały porównane w zależności od stadium choroby. Materiałem do analizy były również: indeks aktywności choroby Crohna – CDAI, wskaźnik Rachmilewicza CAI, klasyfikacja montrealaska oraz indeks masy ciała BMI (body mass index), stężenie białka i albumin w surowicy krwi obwodowej.

3.2. Metoda cytometrii przepływowej

Jako metodę badawczą zastosowano cytometrię przepływową. Oznaczone zostały stężenia wybranych cytokin: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ oraz odestka limfocytów Tregulatorowych: CD3, CD4, CD25/CD3, CD25/CD4 w surowicy krwi obwodowej.

Metoda Cytometric bead array (CBA) oparta jest o działanie spektralnie dyskretnych cząsteczek, które mogą być wykorzystane do wiązania i analizy ilościowej różnorodnych substancji rozpuszczalnych. Pomiar stężenia badanych substancji odbywa się na bazie detekcji emisji fluorescencji i analizy cytometrycznej. Każda cząsteczka (capture bead) pokryta jest specyficznymi dla badanego białka przeciwciałami.

Mieszanina takich cząsteczek (capture bead mixture) umożliwia równoczesną detekcję 6 różnych substancji w pojedynczej próbce płynnej. Dodanie do mieszaniny przeciwciał detektorowych sprzężonych z fikoerytryną (PE) prowadzi do utworzenia analogicznych do ELISA kompleksów kanapkowych. Pomiar i analizę stężenia poszczególnych substratów w próbce przeprowadza się z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz specjalistycznego oprogramowania do analizy CBA.

Jako początek rozwoju cytometrii przepływowej FC (ang. flow cytometry) podaje się rok 1934, kiedy to na łamach *Sciences*, Moldavan opublikował artykuł o metodzie liczenia komórek płynących w kapilarze za pomocą czujnika fotoelektrycznego. Był to jedynie pomysł, którego autor nigdy nie zrealizował. Pierwsze urządzenia powstały w połowie lat 40-tych, natomiast badania zostały rozpoczęte w trakcie trwania II Wojny Światowej celem detekcji bakterii w powietrzu na wypadek użycia broni biologicznej. Z przyczyn oczywistych badania zostały opublikowane dopiero w roku 1947 [12]. Cytometria przepływowa powstała jako metoda liczenia komórek, następnie również do określania ich rozmiarów. W chwili obecnej służy do wieloparametrowej oceny biochemicznych i fizycznych właściwości komórek i ich składowych. Opiera się na zjawisku immunofluorescencji.

Metoda ta może być stosowana do: immunofenotypowania, badania czynnościowego komórek, analizy komórek hematopoetycznych, oceny apoptozy, oceny ploidii DNA. Cytometria przepływowa jest wykorzystywana: w diagnostyce onkohematologicznej, w różnego typu niedoborach immunologicznych celem oceny subpopulacji limfocytów, w diagnostyce niektórych schorzeń autoimmunologicznych (np. badanie obecności autoprzeciwciał przeciw płytkowych w małopłytkowości), jak również w transplantologii – do oznaczania antygenów HLA na powierzchni komórek dawcy i biorcy, w alergologii (ocena skuteczności terapii odczulającej) czy cytogenetyce (np. identyfikacja chromosomu Filadelfia występującego u 95% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową) [12]. Metoda cytometrii przepływowej może stanowić istotną pomoc w diagnostyce i różnicowaniu zmian zlokalizowanych w jamie ustnej, takich jak: owrzodzenia na języku i śluzówce policzków, zmiany grzybicze jamy ustnej, przewlekłe zmiany zapalne przyzębia, afty nawrotowe, których obecność może być związana z nabytymi i wrodzonymi zespołami zaburzeń odporności [32].

Cytometria przepływowa pozwala na szybką analizę dużej liczby obiektów w stosunkowo krótkim czasie, uwzględniając relatywną ocenę wielkości komórek, ich ziarnistości oraz fluorescencji emitowanej przez te komórki. Zaletą tej metody jest możliwość szybkiej i obiektywnej analizy podstawowych populacji komórkowych oraz wieloparametrowa ocena komórek w tym samym czasie. Jednym z nielicznych mankamentów FC, zwłaszcza w zestawieniu z mikroskopią, jest brak rzeczywistego obrazowania analizowanych komórek. Analizowane obiekty, określane w cytometrii jako zdarzenia (ang. events) są wizualizowane na wykresach punktowych lub histogramach za pomocą parametrów bazujących na ich podstawowej morfologii i emitowanej fluorescencji. Cytometr nie rozróżnia także obiektu komórkowego od artefaktu, jeżeli charakteryzują go podobne właściwości optyczne [3,49,90,151,206]. Do mankamentów metody zalicza się również brak prostych sposobów archiwizacji materiału do badania, ponieważ do oznaczeń komórki muszą być żywe [31].

W niniejszej pracy pobrano od pacjentów w trakcie hospitalizacji 10ml krwi obwodowej na czczo. Krew odwirowano z prędkością 1000G przez 10min., w temperaturze 10-15°C, a uzyskaną surowicę zamrożono w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

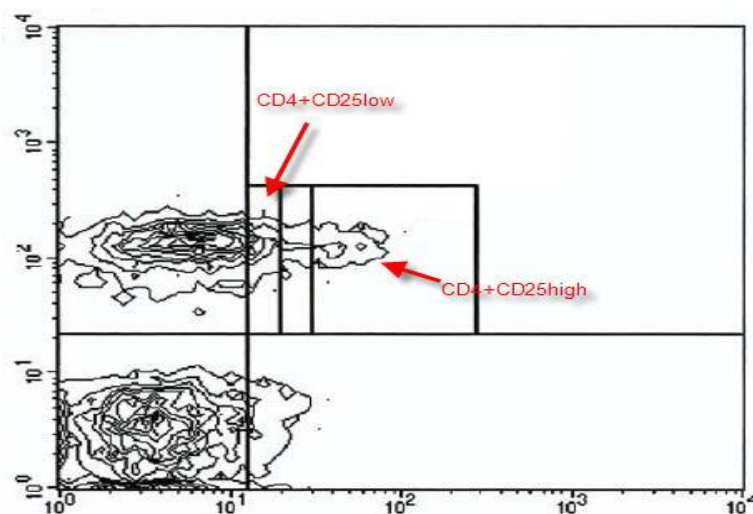
Pomiaru stężenia cytokin Th1 (IL-2, TNF- α , IFN- γ) oraz Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) w surowicy pacjentów z NCHZJ dokonano z wykorzystaniem metody *Th1/Th2 Cytometric Bead Array (BD Bioscience)*. Metoda ta umożliwia równoczesny pomiar sześciu cytokin Th1/Th2 w pojedynczej próbce surowicy. Przygotowanie mieszaniny *capture beads* oraz standardów do pomiaru cytometrycznego przeprowadzono ściśle według zaleceń producenta (*BD Biosciences*). Do dziesięciu probówek kontrolnych dodano po 50 μ L przygotowanych wcześniej standardów w stężeniach rosnących 0 pg/mL, 20 pg/mL, 40 pg/mL, 80pg/mL, 156 pg/mL, 312 pg/mL, 625 pg/mL, 1250 pg/mL, 2500 pg/mL i 5000 pg/mL (*Th1/Th2 Cytokine Standard dilutions*). W pozostałych probówkach umieszczono po 50 μ L surowicy pacjentów. Następnie do wszystkich probówek dodano po 50 μ L mieszaniny *capture beads* oraz 50 μ L zawiesiny przeciwciała detekcyjnego sprzężonego z fikoerytryną (*Th1/Th2 PE Detection Reagent*). Tak przygotowane próbki inkubowano przez 3 godz. w temperaturze pokojowej w ciemności. Po okresie inkubacji do wszystkich probówek dodano po 1 mL buforu (*Wash Buffer*) i odwirowano je przez 5 minut przy prędkości 1500 RPM. Po odwirowaniu próbek oddzielono supernatant, a pelet (osad) zawieszono w 300 μ L

buforu (*Wash Buffer*). Tak przygotowane próbki poddano analizie cytometrycznej z wykorzystaniem cytometru FACScan (*BD Biosciences*) oraz specjalistycznego oprogramowania FCAP Array Software (*Soft Flow Hungary Ltd. for BD Biosciences*). Stężenia poszczególnych cytokin były automatycznie przeliczane względem krzywych standardowych.

Pomiaru poziomu obwodowych limfocytów T regulatorowych dokonano z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej (FACScan, *BD Biosciences, USA*) przy użyciu przeciwciał anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 (*BD Biosciences Pharmingen, USA*). Po spełnieniu wszystkich kryteriów włączenia do badania od pacjentów pobrano krew obwodową na srodek przeciwkrzepliwy (heparyna litowa). Procedurę przygotowania i pomiar próbek krwi przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał (*BD Biosciences, USA*). W każdym przypadku do 20 mL próbki krwi dodano po 5 mL przeciwciał anti-CD3-PE, anti-CD4-PECy5 i anti-CD25-FITC (*BD Biosciences, USA*). Następnie próbkę inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Po zakończeniu inkubacji każdą próbkę zlizowano w celu usunięcia erytrocytów w 400 mL buforu lizującego (*BD Biosciences, USA*) i poddano analizie cytometrycznej na cytometrze przepływowym FACScan (*BD Biosciences, USA*) z wykorzystaniem oprogramowania CellQuest (*BD Biosciences, USA*).

Na rycinie 5 przedstawiono analizę cytometryczną limfocytów T regulatorowych.

Rycina 5 Analiza cytometryczna limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD3+ CD4+CD25^{high} (oś X - CD25-FITC, oś Y - CD4-PECy5; opis skrótów: FITC - izotiocyjanian fluoresceiny, PECy5 - fikoerytryna-Cy5)



3.3. Analiza statystyczna

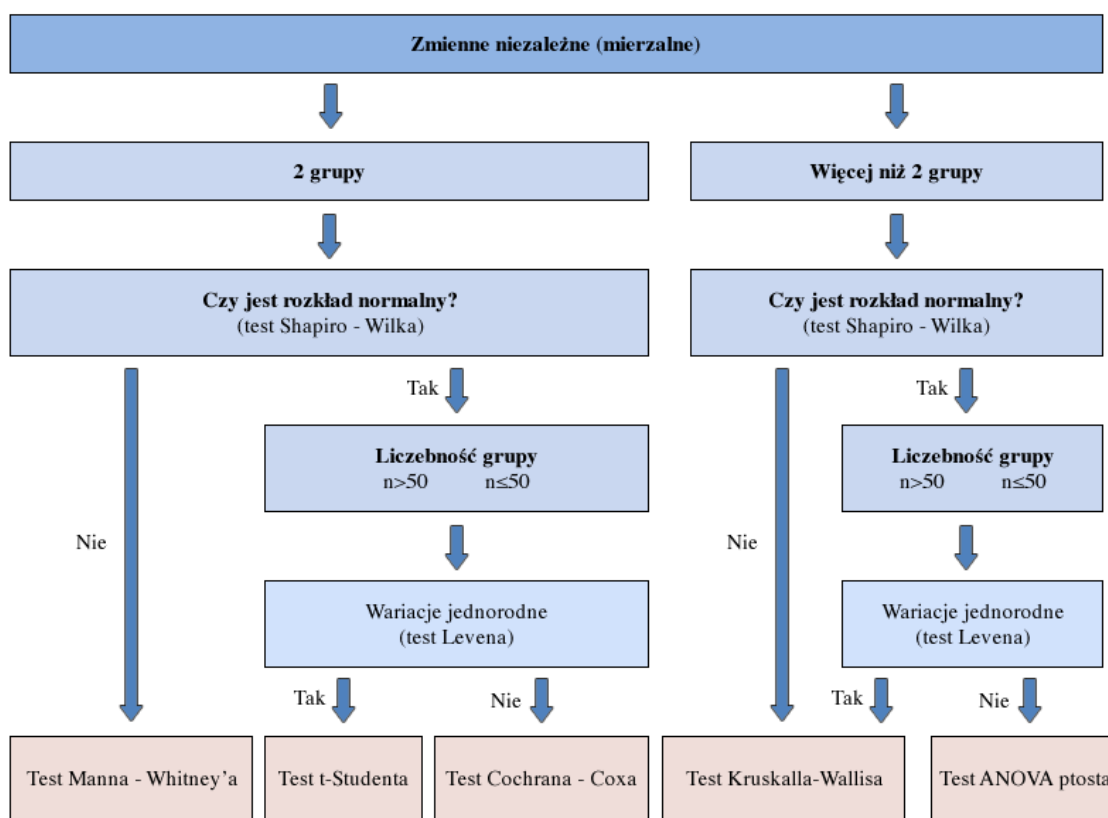
Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu STATISTICA PL firmy StatSoft. Do porównań grupy chorych z ch. L-C z grupą chorych z WZJG użyto testu Manna-Whitneya, jeśli nie wykazano zgodności parametrów z rozkładem normalnym, testu t-Studenta, jeśli wykazano zgodność z rozkładem normalnym i jednorodność wariancji oraz testu Cochran-Coxa, jeśli wykazano zgodność z rozkładem normalnym, ale brak jednorodności wariancji.

Do porównań parametrów między grupami ChLC, WZJG i grupą kontrolną użyto testu Kruskala-Wallis, w przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym, a następnie testu post-hoc testu Dunna w celu określenia między jakimi grupami istnieje statystycznie istotna różnica. W przypadku rozkładu normalnego używano testu ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań, jeśli test ANOVA wykazał różnicę między grupami.

Wyznaczono współczynniki korelacji rang Spearmana dla parametrów w poszczególnych grupach.

Do sprawdzenia zgodności z rozkładem normalnym użyto testu SHAPIRO-WILKA, a do badania jednorodności wariancji użyto testu Levena. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$ [173]. Schemat analizy statystycznej przedstawiono na Rycinie 6.

Rycina 6 Schemat analizy statystycznej wykonanej w pracy.



4. Wyniki

Grupę badaną stanowili pacjenci z nieswoistymi zapaleniami jelit: chorobą Leśniowskiego-Crohna (N= 23, kobiety N=10, mężczyźni N=13) i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (N=28, kobiety N=12, mężczyźni N=16). Materiał pobierano od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych i Dietetyki oraz w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej. Chorzy zgłaszali się z rozpoznaniem wcześniej schorzeniem na podstawie objawów klinicznych, wyników badań biochemicznych, radiologicznych oraz endoskopowych (wynik badania histologicznego wycinka pobranego podczas badania). Operacji z powodu ChLC zostało poddanych 10 osób, a w grupie chorych z WZJG – 11 osób.

W czasie hospitalizacji od każdego pacjenta w grupie badanej pobrano próbkę krwi obwodowej (10ml) i poddano badaniom biochemicznym, dokonano również pomiarów antropometrycznych, określono stopień zaawansowania choroby. W każdej próbce oznaczono również stężenie interleukin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ) oraz odsetek limfocytów regulatorowych: CD3+, CD4+, CD4+/CD25+ w Katedrze Biologii

i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Grupę kontrolną stanowią zdrowi ochotnicy (N=15). Wiek w grupie badanej wynosi $42,96 \pm 15,88$ lat, przy czym wiek kobiet to $48,95 \pm 19,55$ lat, a mężczyzn $38,71 \pm 11,17$ lat. Średnia wieku w grupie chorych L-C wynosi $39,08 \pm 15,57$ lat (średnia wieku kobiet $42,70 \pm 20,90$ lat, mężczyzn $36,50 \pm 10,46$ lat). Średnia wieku w grupie chorych WZJG wynosi $46,17 \pm 15,68$ lat (średnia wieku kobiet $54,17 \pm 17,53$ lat, mężczyzn $40,53 \pm 11,71$ lat) (Tabela 12). Charakterystykę kliniczną badanych chorych z WZJG oraz ChLC przedstawiono w tabeli 12, 13 i 14.

Tabela 12 Średnia wieku w poszczególnych jednostkach chorobowych z podziałem na płeć

		WIEK				
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
GRUPA BADANA	RAZEM	51	42,96	24,00	86,00	15,88
	KOBIETY	22	48,95	24,00	86,00	19,55
	MĘŻCZYŻNI	29	38,71	24,00	65,00	11,17
ChLC	RAZEM	24	39,08	24,00	79,00	15,57
	KOBIETY	10	42,70	24,00	79,00	20,90
	MĘŻCZYŻNI	13	36,50	25,00	59,00	10,46
WZJG	RAZEM	27	46,17	24,00	86,00	15,68
	KOBIETY	12	54,17	25,00	86,00	17,53
	MĘŻCZYŻNI	15	40,53	24,00	65,00	11,71

W tabeli 13 i 14 przedstawiono średnie wartości parametrów biochemicznych. W badanej grupie chorych z ChLC i WZJG.

Tabela 13 Wykładniki laboratoryjne w badanej grupie chorych z ChLC (kolorem szarym zaznaczono parametry zgodne z rozkładem normalnym)

	GRUPA ChLC				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
BMI (kg/m ²)	23	22,03	14,88	39,80	5,54
WBC (thsd/mm ³)	23	8,71	3,10	24,20	4,81
RBC (mil/mm ³)	23	4,53	2,91	5,79	0,69
HGB (g/dl)	23	11,15	5,30	16,20	3,52
HCT (%)	23	36,34	0,42	49,40	10,58
MCV (fL)	17	83,38	63,70	96,70	9,83
MCH (pg)	17	26,99	15,60	31,20	5,45
MCHC (pg)	17	31,77	23,60	35,40	3,62
PLT (thsd/mm ³)	23	307,22	194,00	564,00	98,56
OB (mm/1h)	23	26,78	2,00	84,00	21,68
CRP (mg/dl)	23	9,60	0,10	89,01	19,15
Białko (g/dl)	23	6,75	5,20	7,80	0,70
Albuminy (g/dl)	23	4,26	3,00	7,20	0,89

Tabela 14 Wykładniki laboratoryjne w badanej grupie chorych z WZJG (kolorem szarym zaznaczono parametry zgodne z rozkładem normalnym)

	GRUPA WZJG				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
BMI (kg/m ²)	28	21,62	15,80	28,70	3,29
WBC (thsd/mm ³)	28	6,63	3,70	12,20	2,68
RBC (mil/mm ³)	28	4,93	3,32	9,90	1,42
HGB (g/dl)	28	12,03	6,30	17,10	2,89
HCT (%)	28	38,85	26,40	47,70	4,94
MCV (fL)	25	87,49	79,00	100,20	5,24

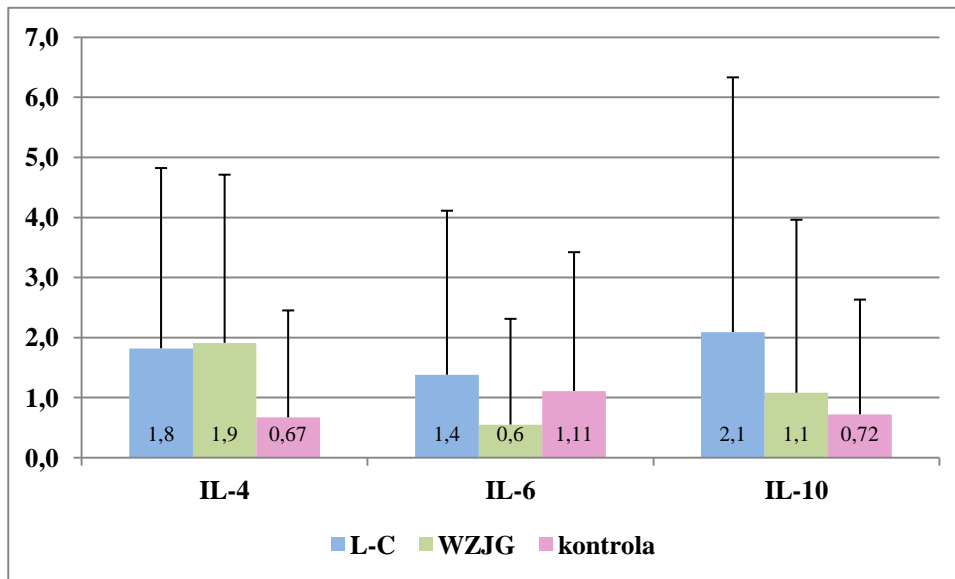
MCH (pg)	25	28,50	16,70	33,30	3,85
MCHC (pg)	25	34,98	28,00	84,00	10,46
PLT (thsd/mm ³)	28	322,21	118,00	611,00	142,54
OB (mm/1h)	28	25,39	1,00	73,00	17,50
CRP (mg/dl)	28	20,97	0,30	155,49	32,91
Białko (g/dl)	28	6,81	4,90	8,30	0,87
Albuminy (g/dl)	28	3,91	2,30	5,30	0,73

Za pomocą testu Manna-Whitneya wykazano statystycznie istotną różnicę między grupą badaną chorych z ChLC z grupą chorych z WZJG dla wykładników zapalenia – stężenie białka C-reaktywnego (CRP), którego średnie stężenie w grupie chorych z ChLC wynosiło $9,60 \pm 19,15$ mg/dl, a w grupie chorych na WZJG odpowiednio $20,97 \pm 32,91$ mg/dl. Natomiast nie wykazano różnicy między następującymi parametrami: odczyn Biernackiego (OB), którego średnie stężenie w grupie chorych z ChLC wynosiło $26,78 \pm 21,68$ mm/1h, a w grupie chorych na WZJG $25,39 \pm 17,50$ mm/1h oraz liczba leukocytów krwi obwodowej (WBC), którego średnia w grupie ChLC wynosiła $8,71 \pm 4,81$ thsd/mm³, a w grupie WZJG $6,63 \pm 2,68$ thsd/mm³.

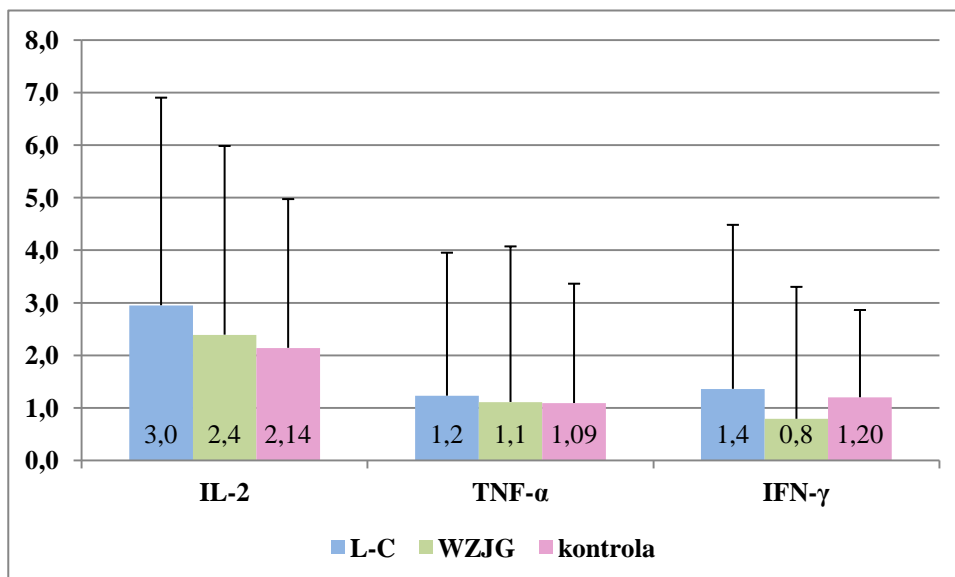
Nie wykazano różnicy w stanie odżywienia pacjentów biorąc pod uwagę obie grupy. Świadczą o tym średnie następujących parametrów: BMI (body mass index) ($22,03 \pm 5,54$ kg/m² dla grupy ChLC, $21,62 \pm 3,29$ kg/m² dla grupy WZJG), stężenie białka w surowicy krwi ($6,74 \pm 0,70$ g/dl dla grupy ChLC, $6,81 \pm 0,87$ g/dl dla grupy WZJG), stężenie albumin w surowicy krwi ($4,26 \pm 0,89$ g/dl dla grupy ChLC, $3,91 \pm 0,73$ g/dl dla grupy WZJG) (Tabela 13 i 14).

W grupie chorych WZJG (rycina 7) wartość IL4 jest wyższa niż w grupie ChLC co wskazuje, że przeważa odpowiedź immunologiczna typu Th2.

Rycina 7 Średnie wartości interleukin w grupie ChLC, WZJG i grupie kontrolnej



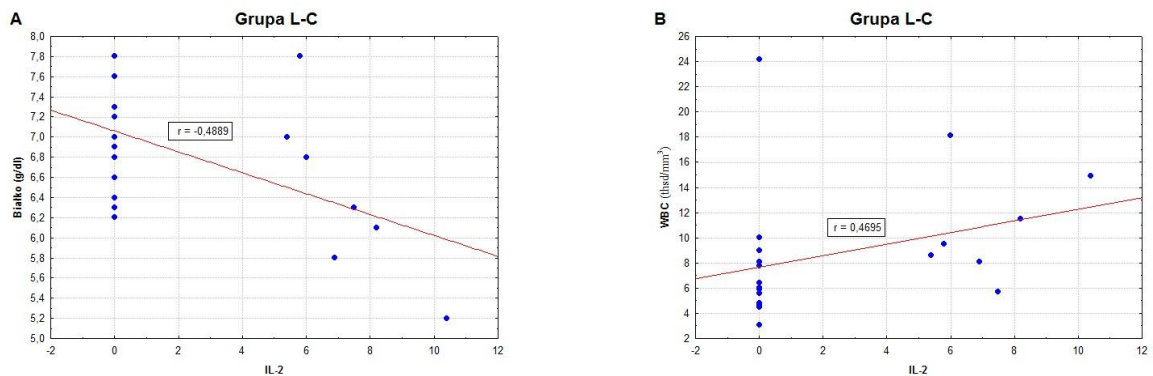
Rycina 8 Średnie wartości IL-2, TNF α i INF γ w grupie ChLC, WZJG i grupie kontrolnej



W grupie chorych z ChLC (rycina 8) stwierdzono wyższe miano w stosunku do kontroli IL2, IFN γ oraz TNF α , co wykazuje zmodyfikowaną odpowiedź immunologiczną Th1 (choroba Th1 zależna).

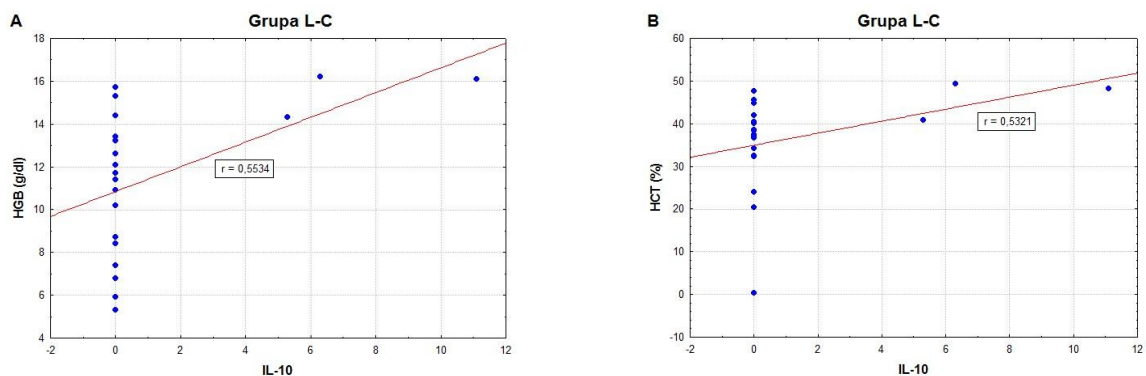
Im większa odpowiedź typu Th1 (IL2) tym gorszy był stan odżywienia pacjenta (mniejsze stężenie białka w surowicy krwi) i bardziej nasilony stan zapalny (wzrost stężenia WBC w surowicy krwi) (rycina 9A i 9B).

Rycina 9 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji dla stężenia IL2 z stężeniem białka w surowicy krwi (A) oraz IL2 z WBC (B) w grupie ChLC



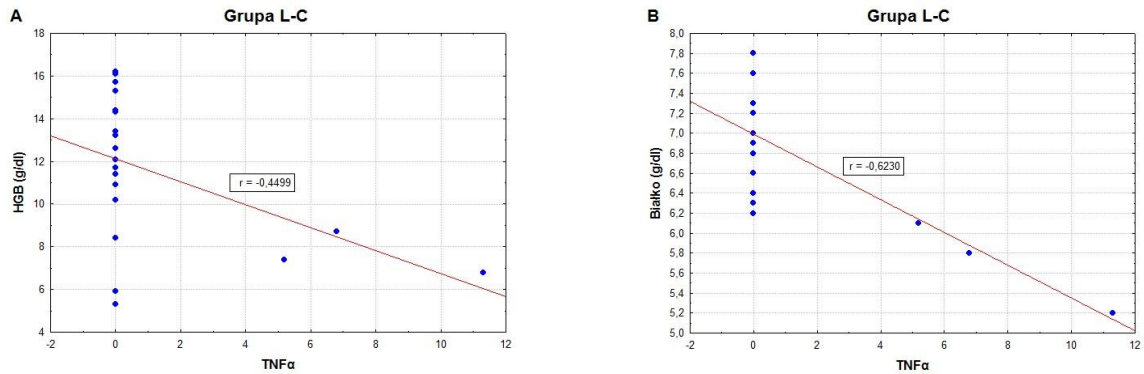
Wyższe stężenia IL10 koreluje z następującymi parametrami: HGB oraz HCT w grupie ChLC (Rycina 10A i 10B).

Rycina 10 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IL10 a HGB (A) oraz IL10 a HCT (B) w grupie ChLC

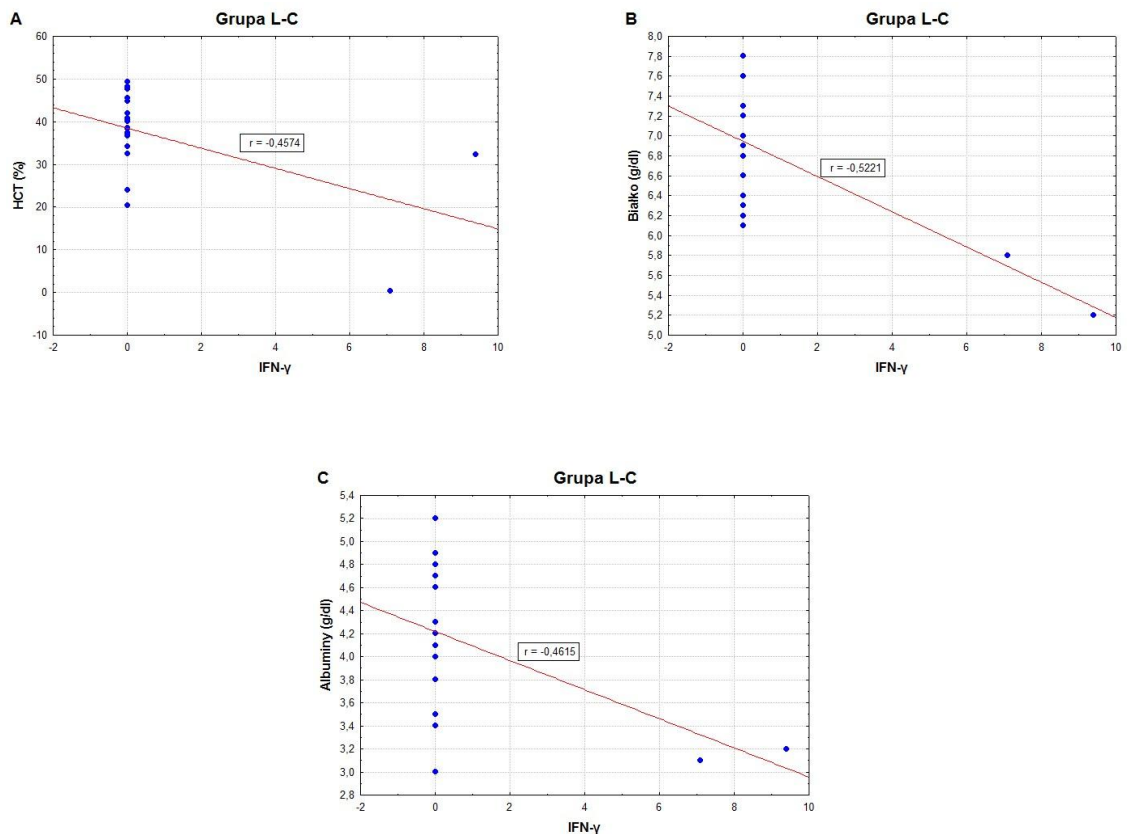


Wzrost stężenia $\text{TNF}\alpha$ powoduje spadek stężenia HGB i białka w surowicy krwi (Rycina 11A i 11B).

Rycina 11 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między TNF α a HGB (A) oraz TNF α (B) a stężeniem białka w surowicy krwi w grupie ChLC



Rycina 12 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IFN γ a HCT (A), IFN γ a stężeniem białka w surowicy krwi (B) oraz IFN γ a stężeniem albumin w surowicy krwi (C) w grupie ChLC



Istnieje przeciętna korelacja między IL2 a WBC (Rycina 9B), gdzie współczynnik korelacji wynosi 0,4695 oraz między IL2 a stężenie białka w surowicy krwi z współczynnikiem korelacji -0,4889 (Rycina 9A). Na Rycinie 10 przedstawiono wysokie

korelacje między IL10 a HGB ($r=0,5539$) oraz IL10 a HCT ($r=0,5321$). Dla TNF α istnieje przeciętna korelacja z HGB ($r= -0,4499$) oraz wysoka korelacja ze stężeniem białka w surowicy krwi ($r= -0,6230$) (Rycina 11). Na Rycinie 12 pokazano przeciętny współczynnik korelacji INF γ z HCT ($r= -0,4574$), INF γ a stężeniem albumin w surowicy krwi ($r= -0,4615$) oraz wysoką korelację między INF γ a stężeniem białka w surowicy krwi ($r= -0,5221$).

W grupie chorych z ChLC (Tabela 15) istnieje bardzo wysoka korelacja między IL2 a IL4 ($r=0,8008$) (Th1/Th2), korelacja wysoka między IL2 a TNF α ($r=0,6962$) i IL2 a IFN γ ($r=0,5464$). Dla parametru IL4 istnieje wysoka korelacja z parametrem TNF α ($r=0,5421$). Między parametrem IL6 a IL10 (Th2) istnieje bardzo wysoka korelacja, gdzie współczynnik korelacji wynosi 0,7449. Istnieje bardzo wysoka korelacja między TNF α a IFN γ ($r=0,8369$) (Th1).

Tabela 15 Zależności stężenia cytokin między sobą (korelacje nieparametryczne rang Spearmana) w grupie ChLC

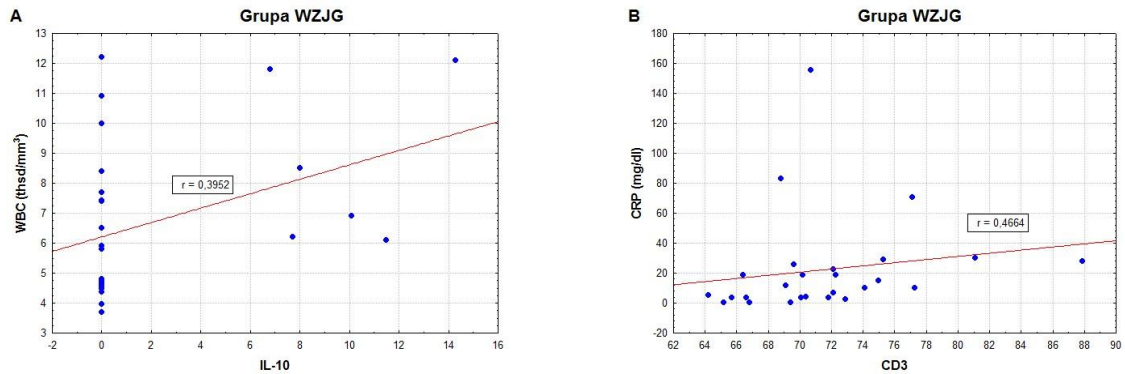
KORELACJE RANG SPEARMANA	współczynnik korelacji r
IL-2 z IL-4	0,8008
IL-2 z TNF- α	0,6962
IL-2 z IFN- γ	0,5464
IL-4 z TNF- α	0,5421
IL-6 z IL-10	0,7449
TNF- α z IFN- γ	0,8369

W Tabeli 16 przedstawiono korelacje cytokin między sobą w grupie WZJG. Istnieje bardzo wysoka korelacja IL4 z IL10 ($r=0,7153$) oraz IL10 z TNF α ($r=0,87,90$). Istnieje wysoka korelacja IL2 z IL4 ($r=0,6705$), IL2 z IL10 ($r=0,6860$), IL2 z TNF α ($r=0,6704$), IL2 z IFN γ ($r=0,5142$), IL4 z IL6 ($r=0,53,94$), IL4 z TNF α ($r=0,5785$), CD3 z CD4 ($r=0,5170$). Istnieje korelacja przeciętna między IL2 a IL6 ($r=0,3780$), IL4 a CD25/CD3 ($r=0,4965$), IL6 a TNF α ($r=0,4981$), IL6 a IFN γ ($r=0,4275$), IL6 a CD25/CD3 ($r=0,4549$), IL10 a IFN γ ($r=0,48,06$), IL10 a CD25/CD3 ($r=0,4684$), TNF α a IFN γ ($r=0,4907$) oraz TNF α a CD25/CD3 ($r=0,3905$).

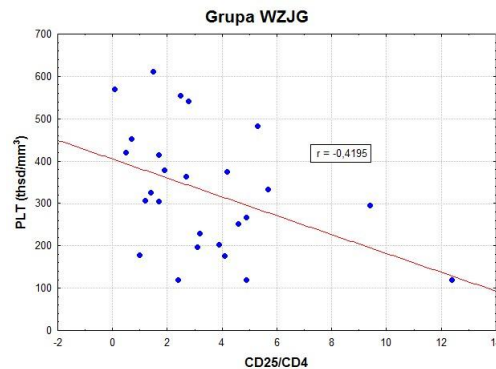
Tabela 16 Zależności stężenia cytokin między sobą (korelacje nieparametryczne rang Spearmana) w grupie WZJG

KORELACJE RANG SPEARMANA	współczynnik korelacji r
IL-2 z IL-4	0,6705
IL-2 z IL-6	0,3780
IL-2 z IL-10	0,6860
IL-2 z TNF- α	0,6704
IL-2 z IFN- γ	0,5142
IL-4 z IL-6	0,5394
IL-4 z IL-10	0,7153
IL-4 z TNF- α	0,5785
IL-4 z CD25/CD3	0,4965
IL-6 z TNF- α	0,4981
IL-6 z IFN- γ	0,4275
IL-6 z CD25/CD3	0,4549
IL-10 z TNF- α	0,8790
IL-10 z IFN- γ	0,4806
IL-10 z CD25/CD3	0,4684
TNF- α z IFN- γ	0,4907
TNF- α z CD25/CD3	0,3905
CD3 z CD4	0,5170

Rycina 13 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IL10 a WBC (A) oraz CD3 a CRP (B) w grupie WZJG



Rycina 14 Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między CD25/CD4 a PLT w grupie WZJG



Istnieje przeciętna korelacja między IL10 a WBC, której współczynnik korelacji wynosi $r=0,3952$ (Rycina 13A) oraz między CD3 a CRP gdzie współczynnik korelacji wynosi $r=0,4664$ (Rycina 13B). Współczynnik korelacji między CD25/CD4 a PLT wynosi $r=-0,4195$ (Rycina 14).

Tabela 17 Porównanie wybranych parametrów grupy badanej (L-C + WZJG 17A) z grupą kontrolną (17B)

A

	GRUPA BADANA				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
IL-2	49	2,71	0,00	11,10	3,77
IL-4	49	1,86	0,00	8,90	2,89
IL-6	49	1,02	0,00	8,10	2,38
IL-10	49	1,66	0,00	14,30	3,72
TNF-α	49	1,18	0,00	11,30	2,80
IFN-γ	49	1,11	0,00	11,30	2,86
CD3	46	71,98	64,20	87,90	4,77
CD4	46	44,02	28,10	62,70	7,92

B

	GRUPA KONTROLNA				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
IL-2	15	4,30	0,00	19,25	6,39
IL-4	15	0,67	0,00	5,10	1,78
IL-6	15	1,11	0,00	6,30	2,31
IL-10	15	0,72	0,00	5,80	1,91
TNF-α	15	1,09	0,00	6,13	2,27
IFN-γ	15	2,73	0,00	8,81	3,59
CD3	15	2,35	0,35	4,92	1,38
CD4	15	2,35	0,35	4,92	1,38

Szarym kolorem oznaczono parametry, które są zgodne z rozkładem normalnym. Sprawdzone to za pomocą testu Shapiro – Wilka.

Testem Levena sprawdzono jednorodność wariancji. $P=0,0002$, dlatego przyjmują, że wariancje nie są jednorodne i porównanie CD4 między grupami wykonano za pomocą testu Cochrańa – Coxa ($p=0,0001$). Istnieje statystycznie istotna różnica między średnią CD4 w grupie badanej, a średnią CD4 w grupie kontrolnej.

Tabela 18 Parametry, które nie posiadały rozkładu normalnego porównane nieparametrycznym testem Manna – Whitney’a

	N ważnych grupa badana	N ważnych grupa kontrolna	p testu
IL-2	49	15	0,6491
IL-4	49	15	0,2502
IL-6	49	15	0,8878
IL-10	49	15	0,6834
TNF-α	49	15	0,9375
IFN-γ	49	15	0,1599
CD3	46	15	0,0000

Za pomocą testu Manna – Whitney’a wykazano statystycznie istotną różnicę między grupą badana a kontrolną dla CD3. Dla reszty parametrów nie wykazano różnicy między grupami.

Tabela 19 Porównanie wybranych parametrów grupy badanej (L-C 19A, WZJG 19B) i grupy kontrolnej 19C.

A

	GRUPA L-C				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
IL-2	21	2,39	0,00	10,40	3,59
IL-4	21	1,91	0,00	6,90	2,80
IL-6	21	0,55	0,00	6,60	1,76
IL-10	21	1,08	0,00	11,10	2,88
TNF-α	21	1,11	0,00	11,30	2,96
IFN-γ	21	0,79	0,00	9,40	2,51
CD3	20	72,45	67,20	84,80	4,17
CD4	20	44,51	28,10	58,10	7,33

B

	GRUPA WZJG				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
IL-2	28	2,95	0,00	11,10	3,95
IL-4	28	1,82	0,00	8,90	3,00
IL-6	28	1,38	0,00	8,10	2,73
IL-10	28	2,09	0,00	14,30	4,24
TNF-α	28	1,23	0,00	8,20	2,72
IFN-γ	28	1,36	0,00	11,30	3,12
CD3	26	71,62	64,20	87,90	5,25
CD4	26	43,65	30,40	62,70	8,46

C

	GRUPA KONTROLNA				
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
IL-2	15	4,30	0,00	19,25	6,39
IL-4	15	0,67	0,00	5,10	1,78
IL-6	15	1,11	0,00	6,30	2,31
IL-10	15	0,72	0,00	5,80	1,91
TNF-α	15	1,09	0,00	6,13	2,27
IFN-γ	15	2,73	0,00	8,81	3,59

Analiza wariancji wykazuje, że istnieje różnica między grupami dla CD4. Testem post-hoc wykazano różnicę dla CD4 między grupą L-C a kontrolą ($p=0,0001$) oraz między WZJG a kontrolą ($p=0,0001$).

Tabela 20 Parametry porównano testem Kruskala – Wallisa

Test Kruskala - Wallisa	p testu
IL-2	0,7844
IL-4	0,3204
IL-6	0,4921
IL-10	0,5928
TNF-α	0,9481
IFN-γ	0,1046
CD3	0,0001
CD25/CD3	0,7508
CD25/CD4	0,5226

Za pomocą testu Kruskala – Wallisa wykazano statystycznie istotną różnicę między grupami badanymi dla CD3.

Za pomocą testu Dunna sprawdzono między którymi grupami istnieje ta różnica. Wykazał on, że istnieje statystycznie istotna różnica między grupą L-C a grupą kontrolną oraz dla WZJG a grupa kontrolną.

W Tabeli 21 przedstawiono średnie wartości parametrów z podziałem na stopień zaawansowania choroby osobno dla grupy osób z ChLC i WZJG.

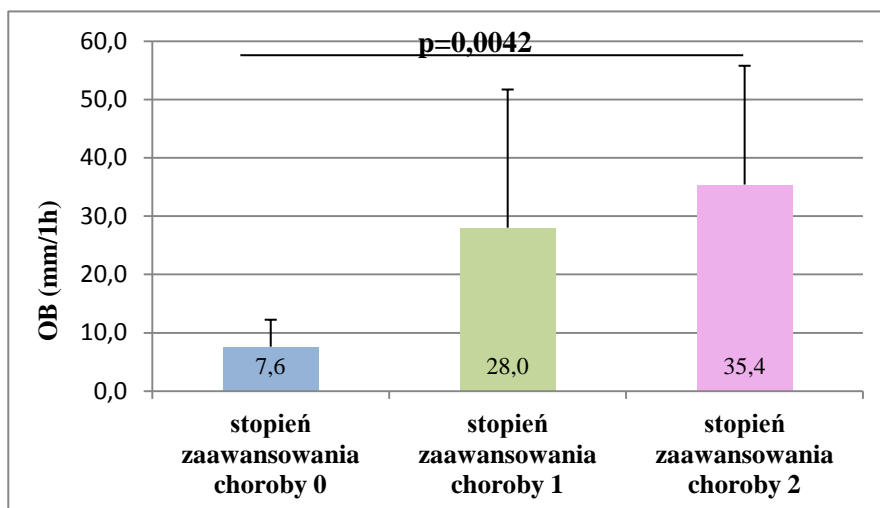
Tabela 21 Średnie wartości badanych parametrów w grupie pacjentów ChLC i WZJG, w zależności od stopnia zaawansowania choroby (kolorem szarym zaznaczono rozkład normalny)

		GRUPA L-C			GRUPA WZJG		
		0	1	2	0	1	2
	BMI (kg/m²)	24,64 ± 5,47	22,91 ± 7,26	20,01 ± 3,41	21,25 ± 2,73	21,10 ± 2,93	22,08 ± 3,80
PARAMETRY LABOLATORYJNE	WBC (thsd/mm³)	5,56 ± 2,42	8,06 ± 3,10	10,81 ± 5,97	6,12 ± 2,05	7,23 ± 3,13	6,43 ± 2,68
	RBC (mil/mm³)	4,68 ± 0,45	4,37 ± 0,72	4,59 ± 0,79	4,45 ± 0,79	4,84 ± 1,31	5,17 ± 1,67
	HGB (g/dl)	14,04 ± 1,56	10,99 ± 3,80	9,83 ± 3,36	13,86 ± 2,49	11,91 ± 2,44	11,46 ± 3,19
	HCT (%)	41,70 ± 3,33	36,04 ± 7,12	33,89 ± 14,36	40,68 ± 7,12	38,89 ± 2,70	38,16 ± 5,37
	MCV (fL)	89,28 ± 4,57	83,93 ± 9,80	77,92 ± 11,20	92,16 ± 5,72	87,61 ± 4,26	85,46 ± 4,70
	MCH (pg)	30,04 ± 1,27	27,75 ± 5,89	23,70 ± 6,00	31,36 ± 1,10	27,95 ± 4,83	27,67 ± 3,51
	MCHC (pg)	33,68 ± 1,64	32,12 ± 3,89	29,83 ± 4,05	34,06 ± 1,21	39,85 ± 17,87	32,11 ± 2,85
	PLT (thsd/mm³)	247,00 ± 41,98	293,38 ± 83,14	348,40 ± 116,26	264,60 ± 141,20	307,22 ± 134,17	352,43 ± 150,24
Wykładniki zapalenia	OB (mm/1h)	7,60 ± 4,62	28,00 ± 23,69	35,40 ± 20,36	28,80 ± 26,63	25,56 ± 16,80	24,07 ± 15,42
	CRP (mg/dl)	1,78 ± 1,19	4,64 ± 3,87	17,49 ± 27,56	25,13 ± 33,35	27,69 ± 48,76	15,16 ± 19,25
Stan odżywienia	Białko (g/dl)	7,22 ± 0,43	6,75 ± 0,89	6,51 ± 0,56	7,83 ± 0,44	6,70 ± 0,66	6,53 ± 0,87
	Albuminy (g/dl)	4,60 ± 0,49	4,18 ± 0,60	4,15 ± 1,22	4,01 ± 0,72	3,75 ± 0,45	3,99 ± 0,89

CYTOKINY	IL-2	1,45 ± 2,90	2,56 ± 4,45	2,65 ± 3,49	4,00 ± 5,53	2,36 ± 3,85	2,96 ± 3,63
	IL-4	0,00 ± 0,00	2,43 ± 3,04	2,32 ± 3,05	2,78 ± 4,05	1,51 ± 3,01	1,67 ± 2,77
	IL-6	1,65 ± 3,30	0,00 ± 0,00	0,50 ± 1,58	1,22 ± 2,73	1,17 ± 2,32	1,56 ± 3,13
	IL-10	1,33 ± 2,65	1,59 ± 4,20	0,63 ± 1,99	2,02 ± 4,52	2,48 ± 5,16	1,86 ± 3,82
	TNF-α	0,00 ± 0,00	1,61 ± 4,27	1,20 ± 2,56	1,64 ± 3,67	0,57 ± 1,70	1,50 ± 3,00
	IFN-γ	0,00 ± 0,00	1,34 ± 3,55	0,71 ± 2,25	0,00 ± 0,00	1,48 ± 2,95	1,77 ± 3,73
Odsetek limfocytów Tregulacyjnych	CD3	75,75 ± 7,05	70,67 ± 1,05	72,36 ± 3,69	66,96 ± 2,50	72,66 ± 3,74	72,79 ± 6,15
	CD4	42,40 ± 6,62	43,20 ± 2,86	46,46 ± 9,86	37,40 ± 3,79	48,34 ± 9,53	42,73 ± 7,39

Testem Kruskala-Wallisa wykazano statystycznie istotną różnicę między stopniami zaawansowania choroby w grupie ChLC dla średniej wartości OB ($p=0,0165$). Test post-hoc wykazał, że różnica ta istnieje między stopniem 0 a 2 stopniem zaawansowania choroby (Rycina 15).

Rycina 15 Średnie wartości OB w grupie L-C dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby

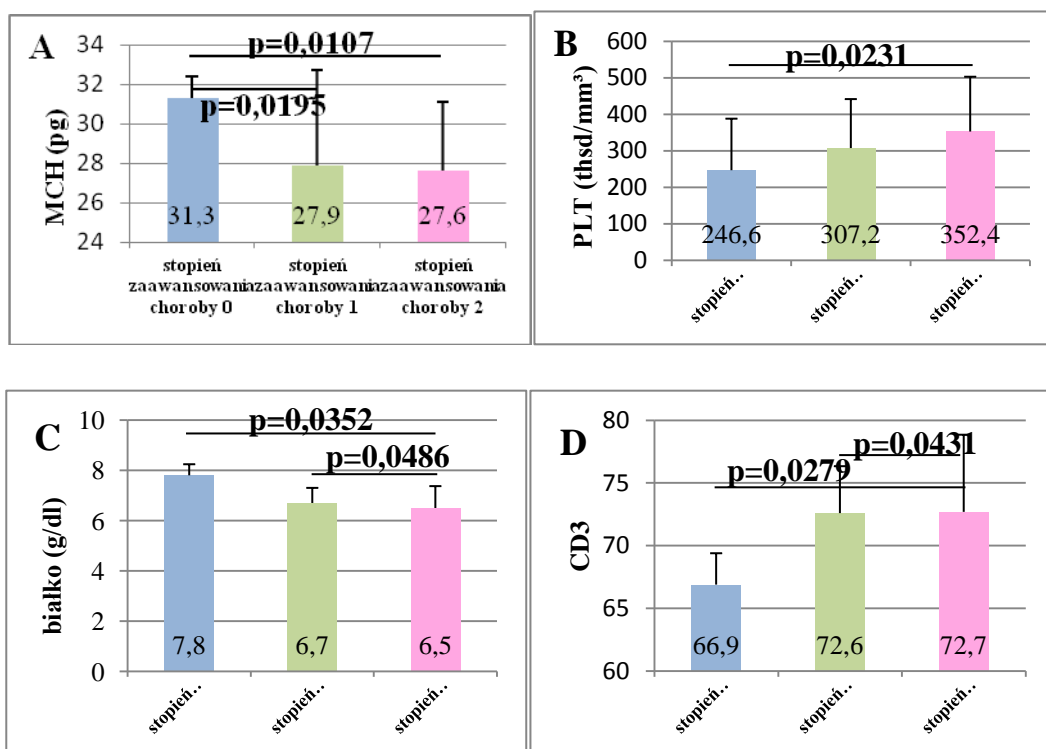


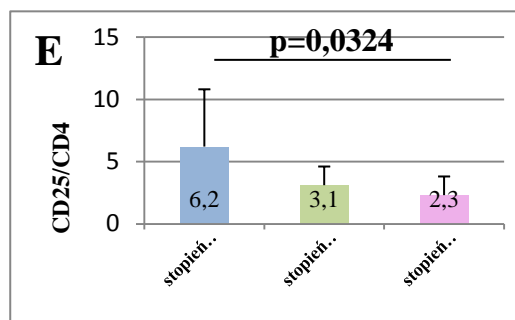
W grupie WZJG testem post-hoc wykazano:

- statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 1 oraz między 0 i 2 stopniami zaawansowania choroby dla MCH (Rycina 16A),
- statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 2 stopniem zaawansowania choroby dla PLT (Rycina 16B),

- statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 1 oraz między 0 i 2 stopniami zaawansowania choroby dla stężenia białka w surowicy krwi (Rycina 16C),
- statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 1 oraz między 0 i 2 stopniami zaawansowania choroby dla CD3 (Rycina 16D),
- statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 2 stopniem zaawansowania choroby dla CD25/CD4 (Rycina 16E).

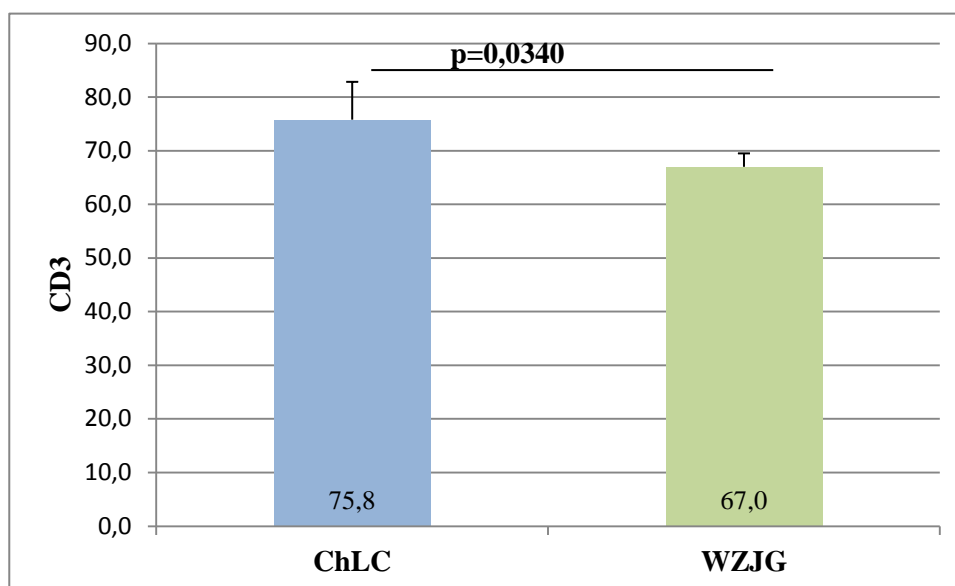
Rycina 16 Średnie wartości parametrów dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby: MCH (A), PLT (B), białka (C), CD3 (D), CD25/CD4 (E)



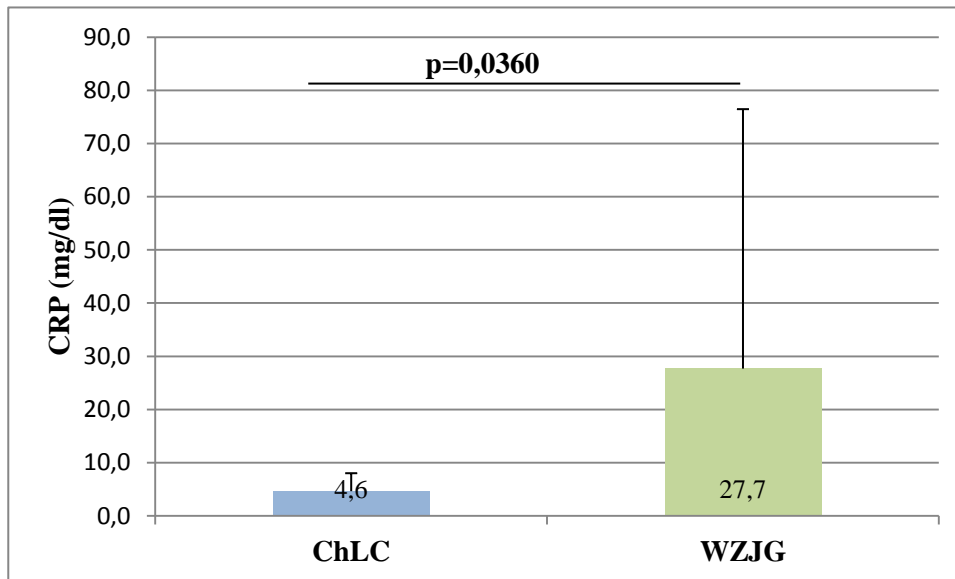


Na Rycinie 17 przedstawiono statystycznie istotną różnicę z zastosowaniem testu Cochran-Coxa między grupą ChLC a WZJG u pacjentów z 0 stopniem zaawansowania choroby ($p=0,0340$). Dla 1-wszego stopnia zaawansowania choroby za pomocą testu Manna-Whitneya wykazano statystycznie istotną różnicę dotyczącą parametru CRP między grupami pacjentów z ChLC a WZJG ($p=0,0360$) (Rycina 18). Testem Manna-Whitneya wykazano również statystycznie istotną różnicę między grupą ChLC a WZJG dla WBC u pacjentów z 2-gim stopniem zaawansowania choroby (Rycina 19).

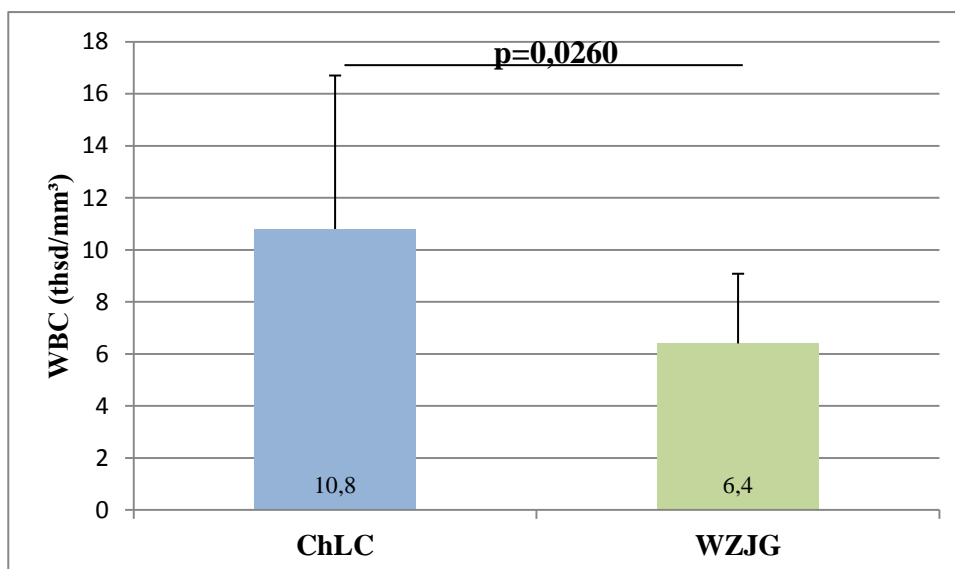
Rycina 17 Średnie wartości CD3 w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów 0 stopniem zaawansowania choroby



Rycina 18 Średnie wartości CRP w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów z 1-wszym stopniem zaawansowania choroby



Rycina 19 Średnie wartości WBC w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów z 2-gim stopniem zaawansowania choroby



Za pomocą testu Dunna sprawdzono między którymi grupami istnieje ta różnica. Wykazał on, że istnieje statystycznie istotna różnica między grupą L-C a grupą kontrolną oraz dla WZJG a grupą kontrolną.

5. Dyskusja

W efekcie obecnie przeprowadzanych badań u ludzi w wielu światowych jednostkach nie uzyskano jednoznacznych wyników dotyczących wpływu procesu immunologicznego na przebieg NCHZJ. Poznanie korelacji pomiędzy procesem zapalnym jelita a zachowaniem się cytokin w kontekście aktywności choroby oraz stanu odżywienia pacjentów może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale również nieść za sobą potencjalne implikacje terapeutyczne. Można przypuszczać, że postępy w terapii biologicznej, której celem jest neutralizacja cytokin prozapalnych, wzmocnienie cytokin przeciwzapalnych a przez to modyfikacja etapów procesu zapalnego, mogłaby poprawić przebieg choroby i jakość życia pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Sekwencja zdarzeń leżących u podstaw reakcji zapalnej w NCHZJ jest niezwykle złożona, brane są pod uwagę zarówno zmieniające się czynniki środowiskowe, do których zaliczyć należy czynniki infekcyjne i zmiany mikroflory przewodu pokarmowego, czynniki powodujące ekspresję genową oraz czynniki modulujące działanie układu immunologicznego. Pomimo wielu prób interpretacji, większej ilości danych i coraz większej wiedzy na temat patofizjologii tych schorzeń wiele czynników pro- i przeciwzapalnych oraz ich zależności nie zostało poznanych.

Należy wziąć pod uwagę fakt, że najbardziej charakterystycznym objawem NCHZJ, jest biegunka, w przypadku WZJG spowodowana jest ona zmianami zapalnymi w błonie śluzowej odbytnicy, a w ChLC charakter biegunki zależny jest od lokalizacji zmian. Współcześnie, przyczyną biegunki mogą też być infekcje przewodu pokarmowego *Clostridium difficile*. Nie wyjaśniono jak dotąd, dlaczego tylko u części osób z NCHZJ dochodzi do pełnoobjawowej manifestacji infekcji, czyli do wystąpienia głównego objawu jakim jest biegunka. Istnieje przypuszczenie, że reakcja zapalna jelita zależy od genetycznie uwarunkowanych przyczyn, które do chwili obecnej są jeszcze nieznane. Do chwili obecnej nie udało się ustalić, czy zakażenie *Clostridium difficile* powoduje zaostrzenie nieswoistych zapaleń jelit, czy też może stan zapalny towarzyszący chorobie przewlekłej jest czynnikiem predysponującym do rozwoju bakterii czego skutkiem jest zakażenie [201].

Wykazano, że u chorych na NCHZJ występuje zwiększona aktywność układu immunologicznego przejawiająca się zwiększoną liczbą cytokin prozapalnych. Zwiększona aktywność układu immunologicznego może prowadzić do wystąpienia

przewlekłych zmian zapalnych oraz trudno gojących się owrzodzeń, podczas gdy prawidłowa odpowiedź immunologiczna chroni błonę śluzową jelita przed uszkodzeniem.

Trudno jest ustalić, czy opisywane w licznych opracowaniach zaburzenia odporności są przyczyną czy też skutkiem choroby i jaką mają wartość diagnostyczną. W warunkach fizjologicznych odsetek limfocytów T stanowi około 10% komórek, przypuszczalnie w warunkach patologicznych odsetek tych komórek może być znacznie wyższy, co mogło mieć wpływ na wyniki badań [168, 169, 171].

Poznanie mechanizmów oddziaływania interleukin w NCHZJ otwiera nowe kierunki leczenia biologicznego, jak również pozwala na nowe spojrzenie na patogenezę tych chorób.

Niezależnie od etiopatogenezy wydaje się oczywistym fakt, że w przebieg procesu zapalnego w jelicie są zaangażowane różne populacje komórek, do których należy zaliczyć zarówno komórki napływające do miejsca zapalenia (eozynofile, neutrofile, limfocyty), jak i komórki strukturalne (makrofagi, fibroblasty, komórki nabłonkowe, komórki dendrytyczne, komórki tuczne).

Cytokiny stanowią system regulacji wielu układów, w tym układu nerwowego i tkanki łącznej, regulują proliferację, różnicowanie komórek, mają również właściwości hormonopodobne, kontrolują wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej (indukcyjną, efektorową, wygaszającą), są mediatorami procesów zapalnych, procesów naprawy i gojenia się tkanek.

Pozostają zagadnienia, których wciąż nie udało się wyjaśnić, można do nich zaliczyć brak dobrych markerów do oceny aktywności choroby, ciężkości zaostrzenia czy oceny odpowiedzi na zastosowane leczenie, a tym samym na prognozowanie przebiegu choroby - brak idealnego wskaźnika aktywności choroby sprawia, że posługiwać się możemy zatem jedynie niedoskonałymi wskaźnikami klinicznymi aktywności choroby.

Istnieje szereg mechanizmów kontrolujących produkcję cytokin. Do grupy czynników mających wpływ na sekrecję cytokin zaliczyć można mechanizm wykorzystujący ich neutralizację po związaniu z rozpuszczalnymi receptorami lub białkami wiążącymi dane cytokiny. Należy wziąć pod uwagę również fakt, że cytokiny są produkowane w formie prekursorów, które są biologicznie nieaktywne, a aby uzyskać formę aktywną

niezbędna jest obecność specyficznych enzymów proteolitycznych. Istotnym też jest istnienie antagonistów receptorów, których wiązanie kompetencyjnie uniemożliwia dostępność receptora dla agonisty. Niektóre cytokiny wykazują efekt biologiczny poprzez promocję odpowiedniego typu odpowiedzi immunologicznej [53,68,93,137].

Opierając się na powyższych faktach w niniejszej pracy podjęto próbę oceny niektórych cytokin w przebiegu przewlekłych chorób nieswoistych jelit. Oceniano zachowanie się wybranych cytokin zarówno w okresie zaostrzeń, jak i w fazie remisji u chorych cierpiących z powodu ChLC oraz pacjentów z WZJG. Do oceny nasilenia choroby posłużono się klasyfikacją montrealską, obliczono wskaźnik CDAI w przypadku pacjentów z ChLC oraz wskaźnik Rachmilewicza (CAI) w przypadku pacjentów z WZJG i sklasyfikowano pacjentów w fazie remisji oraz zaostrzenia (małe, umiarkowane, ciężkie). Przeprowadzono również analizę stanu odżywienia pacjentów. Jako narzędzia do jego oceny posłużyły następujące wskaźniki: masa ciała, wzrost, wskaźnik BMI, stężenie białka i albumin w surowicy krwi obwodowej.

W pracy oceniono również badania podstawowe, w tym zachowanie się parametrów morfotycznych krwi wraz z rozmazem krwi obwodowej, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic leukocytozy pomiędzy chorymi w badanych grupach. Analizując liczbę krwinek czerwonych i stężenie hemoglobiny nie wykazano statystycznie istotnych różnic, które mogłyby być podstawą do rozpoznania niedokrwistości w badanych grupach chorych.

Zgodnie z kryteriami podziału ciężkości obu badanych grup stwierdzono najniższe parametry hemoglobiny i najmniejszą liczbę erytrocytów u chorych zaliczanych do grupy WZJG o ciężkim przebiegu. Tak więc z całą pewnością można stwierdzić, że rozległe zapalenie błony śluzowej jelita i w konsekwencji krwawienie do światła jelita grubego odzwierciedla się obniżeniem wyżej wymienionych parametrów i koreluje z ciężkością zmian, co jest w pełni zgodne z kryteriami montrealскими.

U chorych z NCHZJ, pomimo klinicznej remisji choroby, można stwierdzić istotne zaburzenia dotyczące odporności komórkowej, które są następstwem toczącego się przewlekłego procesu zapalnego błony śluzowej jelita. W patogenezie zapalenia uczestniczy szereg komórek oraz uwalnianych przez nie mediatorów, do których należą między innymi cytokiny. Zachowanie się cytokin w surowicy krwi w niniejszym badaniu zostało przeprowadzone metodą cytometrii przepływową.

TNF α pełni istotną rolę w rozwoju zmian zapalnych w jelicie. Zwiększone wytwarzanie TNF α wiąże się ze wzrostem jego stężenia w śluzówce i świetle jelita oraz koreluje z klinicznymi i laboratoryjnymi wskaźnikami procesu zapalnego. Stwierdza się również znacząco wyższe stężenia tej cytokiny w aktywnej fazie choroby niż w okresie remisji, co potwierdza korelację ze stopniem zaawansowania choroby [150,152]. Czynnikiem martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor* – TNF- α) jest wielofunkcyjną cytokiną, wywierającą plejotropowe biologiczne działania w różnych tkankach. Występuje w dwóch formach: rozpuszczalnej – 17 kDa oraz błonowej – 26 kDa. Forma rozpuszczalna jest produktem proteolitycznego rozpadu formy błonowej (mTNF- α) przy udziale enzymu konwertującego TNF- α . Czynnikiem martwicy nowotworów jest produkowany głównie przez aktywowane makrofagi i limfocyty w miejscu zapalenia i razem z interleukinami 6 oraz 1 (IL-6, IL-1) bierze udział w miejscowej i układowej reakcji zapalnej [134]. W opracowaniu Ahirwar DK i wsp. stwierdzono, że wysoka produkcja TNF α (C-863A), jest związana z wyższym ryzykiem wystąpienia NCHZJ, szczególnie WZJG [2].

Prezentowane wyniki badań nie wykazały statystycznie istotnej różnicy w wartościach TNF α i IFN γ w grupie chorych na ChLC oraz WZJG w porównaniu z grupą kontrolną. W badaniach przeprowadzonych przez Kohut M i wsp. wykazano, że największą wartość diagnostyczną w różnicowaniu osób zdrowych oraz chorych na CD wykazuje surowicze stężenie TNF- α , które wartością diagnostyczną nie przewyższa jednak białka CRP [93].

Należy zauważyć istnienie badań, które są potwierdzeniem uzyskanych w prezentowanej pracy wyników, w piśmiennictwie pojawia się opinia o nieprzydatności stężeń TNF α do oceny aktywności choroby (Nielsen OH i wsp.) [130]. Jednak jeśli chodzi o inne wykładniki toczącego się procesu zapalnego, wykazano statystycznie istotną różnicę w stężeniu parametru CRP między grupą pacjentów z ChLC ($9,60 \pm 19,15$ mg/dl) i WZJG ($20,97 \pm 32,91$ mg/dl). I tak istotnie wyższe stężenie CRP obserwowano u chorych z zaostrzeniem WZJG porównując z fazą remisji choroby. Poziom białka ostrej fazy, jakim jest CRP jest bardzo czułym wskaźnikiem procesu zapalnego, jest syntetyzowane przez hepatocyty w wątrobie pod wpływem stymulacji IL-6, TNF α , IL1 β w miejscu zapalenia. Poziom CRP oznaczany w surowicy krwi wzrasta w przebiegu zapalenia toczącego się niezależnie od etiologii, jest lepszym wskaźnikiem tego procesu niż odczyn opadania krwinek Biernackiego (OB).

Vermeire S i wsp. zwracają uwagę na niewielką wartość wskaźnika CRP w przypadku WZJG, mimo toczącego się ostrego procesu zapalnego z niewyjaśnionych dotąd przyczyn, podczas gdy w ChLC stężenia CRP korelują z aktywnością choroby, wartościami obliczonymi w klasyfikacji CDAI, stężeniem amyloidu w surowicy oraz IL-6 i kalprotektyną w kale. Poza tym wzrost wartości CRP > 45 mg/l predysponuje do konieczności leczenia operacyjnego [196].

W niniejszej pracy nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu OB w ChLC oraz WZJG. Tsampalieros A i wsp. donoszą, że w badaniach rutynowych u dzieci z noworozpoznanym NCHZJ pomimo, że poziom CRP był podwyższony, u części pacjentów ze średniozaawansowanym stopniem WZJG poziom białka CRP był w normie [189]. Henriksen M i wsp. (IBSEN Study Group) przeprowadzili w Norwegii badania na grupie 454 pacjentów z UC oraz 200 pacjentów z CD stężenia CRP w surowicy krwi w chwili rozpoznania choroby oraz po 5 latach jej trwania. W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono wyższe stężenie CRP u chorych z CD niż u chorych z UC, przy czym u pacjentów z UC stężenie CRP rosło wraz ze zwiększającym się stopniem zaawansowania choroby [77]. Solem CA i wsp. wykazali natomiast, że zarówno w ChLC, jak i w WZJG poziom białka CRP jest ściśle związany z aktywnością choroby, zapaleniem obserwowanym w endoskopii, aktywnością zapalenia ocenianą w histopatologii (u pacjentów z CD) i innymi wykładnikami zapalenia, lecz nie z aktywnością choroby ocenianą w badaniach radiologicznych [172].

Langhorst J i wsp. oceniali markery zapalenia w chorobach zapalnych jelit (laktoferynę, kalprotektynę, PMN-e – elastazę granulocytów wielojądrzastych w kale, CRP, wskaźniki kliniczne) u 139 pacjentów z chorobami jelit (54 pacjentów z zespołem jelita drażliwego, 42 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, 43 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna). W badaniach tych wykazano najwyższą dokładność diagnostyczną kalprotektyny w przypadku osób z CD (81,4%), natomiast laktoferyny w UC (83,3%). Stwierdzono, że na podstawie poziomu laktoferyny, kalprotektyny oraz PMN-e w kale jesteśmy w stanie odróżnić fazę aktywną od nieaktywnej choroby, ale dokładność diagnostyczną jesteśmy w stanie uzyskać tylko łącząc te elementy z poziomem CRP w surowicy oraz indeksem aktywności choroby [104]. Reasumując wydaje się być bardziej zasadnym oznaczanie markerów w kale, jednak dopóki nie ma dostępnych szczegółowych danych na ten temat, użycie CRP i pozostałych parametrów

laboratoryjnych powinno być postrzegane jako narzędzie dodatkowe do obserwacji klinicznej oraz badania fizykalnego pacjenta.

W przedstawionej pracy zbadano zachowanie się szeregu cytokin: przeciwzapalnych – IL-4, IL-10 oraz prozapalnych – IL-2, IL-6, TNF α , IFN γ w surowicy krwi. Według powszechnej wiedzy, w patogenezie NCHZJ istotnym elementem jest istnienie braku równowagi między cytokinami prozapalnymi (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, TNF α , IFN γ) a cytokinami przeciwzapalnymi (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13) [138,151]. IL-2 wytwarzana głównie przez limfocyty Th1, wpływa na proliferację i różnicowanie limfocytów T, ma duże znaczenie w powstawaniu pierwotnej odpowiedzi immunologicznej limfocytów B, zwiększa wytwarzanie immunoglobulin, pobudza wytwarzanie IL-4, IL-5, IFN γ [137]. IL-4 jest cytokiną produkowaną głównie przez komórki tuczne i limfocyty T, hamuje produkcję IFN γ , IL-1 β , TNF α , aktywuje syntezę IL-10 [68]. IL-6 wytwarzana przez limfocyty typu B i T, monocyty, makrofagi, osteoblasty, fibroblasty, komórki śródbłonna, astrocyty, adipocyty. Jej gen został zlokalizowany na ramieniu krótkim 7 chromosomu (7p15-p21) [68]. Bierze udział w procesach prozapalnych, jednak w dużych stężeniach działa przeciwzapalnie indukując produkcję białek ostrej fazy (haptoglobiny, kwaśnej α 1 glikoproteiny, fibrynogenu, białka C-reaktywnego) w hepatocytach, oraz hamując stymulowane przez TNF α i IL-1 β wytwarzanie komórek jednojądrzastych.

Obecnie wiadomo, że produkcję białek ostrej fazy mogą wywołać również IL-1, TNF α , IFN γ . IL-10 jest przeciwzapalną cytokiną, pełni rolę czynnika hamującego odpowiedź immunologiczną poprzez hamowanie wytwarzania limfocytów Th1 pobudzonych przez antygen oraz wstrzymuje proces wytwarzania przez nie cytokin zapalnych takich jak IFN- γ , IL-2.

Jednym z czynników pobudzających wydzielanie IL-10 jest TNF- α . IL-10 wydzielana jest głównie przez limfocyty Th2 oraz Treg, limfocyty B, monocyty, makrofagi, eozynofile [33,66].

Przedstawione wyniki powyższych badań nie wykazały różnic w stężeniach tych cytokin w surowicy krwi między ChLC, WZJG a grupą kontrolną. Stwierdzono natomiast statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 1 oraz między 0 i 2 stopniami zaawansowania choroby dla CD3 oraz statystycznie istotną różnicę pomiędzy 0 a 2

stopniami zaawansowania choroby dla CD25/CD4 u pacjentów z WZJG. Stwierdzono wysokie korelacje zależności cytokin między: IL-2 a IL-4, IL-6 a IL-10, TNF α a IFN γ .

Zaobserwowano brak istotnych różnic w parametrach CD25/CD3 oraz CD25/CD4 między pacjentami z NCHZJ a grupą kontrolną. Natomiast stwierdzono różnice w wartościach CD3 i CD4 między ChLC, WZJG a grupą kontrolną.

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że cytokiny nie mogą być uniwersalnym markerem oceny ciężkości NCHZJ biorąc pod uwagę dodatkowo fakt małej stabilności interleukin w surowicy krwi. Można wnioskować, iż bardziej zasadnym byłoby oznaczanie stężenia cytokin w błonie śluzowej jelita, gdzie trwałość ich jest większa. Należy również pamiętać o znaczeniu klinicznym receptorów dla interleukin, bowiem jedna z teorii mówi, że dysproporcje między syntezą a produkcją wiążących je rozpuszczalnych receptorów, to podstawowy mechanizm zaburzenia równowagi między procesami, które nasilają bądź hamują zapalenie w NCHZJ, co więcej, może posłużyć do oceny stopnia zaawansowania choroby na poziomie molekularnym [53].

Istotną przyczyną prawidłowych wartości stężenia cytokin przeciwzapalnych może być fakt, że cytokiny te są uwalniane również w przypadku infekcji bakteryjnej czy posocznicy, a stany te niejednokrotnie towarzyszą przebiegowi choroby podstawowej jaką są NCHZJ. Podczas niniejszego badania nie oceniano czynników takich jak objawy pozajelitowe czy rodzaj terapii, które w istotny sposób mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Ważnym spostrzeżeniem wydaje się być zaobserwowany w badaniu wzajemny stosunek stężeń cytokin względem siebie, bowiem podkreśla się znaczenie sprzężenia zwrotnego między cytokinami. Przegląd licznych publikacji na temat zachowania się tych cytokin w surowicy u chorych z NCHZJ wskazuje na zasadniczo odmienne wyniki, które zależne są być może od badanej populacji, aktywności choroby, czasu jej trwania oraz innych czynników. I tak w badaniu Żabka A i wsp. w grupie pacjentów z NCHZJ nie stwierdzili w surowicy krwi obwodowej istotnych statystycznie różnic w stężeniu IL-10 w porównaniu z grupą kontrolną [207].

Natomiast w badaniach na 30 pacjentach z NCHZJ Woźniak-Stolarska B i wsp. oceniali stężenie IL-10 w surowicy chorych porównując te wartości do stężeń IL-10 w

surowicy 10 zdrowych ochotników, oznaczeń dokonywano metodą ELISA. Otrzymali podwyższone i wysokie stężenia IL-10 w surowicy krwi pacjentów z NCHZJ, co korelowało z wysoką aktywnością schorzenia [199].

W duńskim badaniu Andersen V i wsp., gdzie grupę badaną stanowiło: 336 osób z CD, 498 osób z CU oraz 779 osób zdrowych, sugeruje się, że IL-10 odgrywa znaczącą rolę w etiologii NCHZJ w tej populacji ludności [4].

Hosokawa T i wsp. oceniali IL-6 i regulację jej ekspresji w badaniu szczurów, wykazując dodatnią korelację IL-6 ze stopniem aktywności choroby [80].

Analizując stan odżywienia pacjentów na podstawie uzyskanych wyników BMI, stężenia białka oraz stężenia albumin w surowicy krwi zarówno pacjentów z ChLC jak i WZJG w niniejszej pracy, nie wykazano istotnych różnic między tymi jednostkami chorobowymi, nie można też na podstawie uzyskanych wyników rozpoznać zwiększonej tendencji do występowania niedożywienia w badanej grupie chorych.

Z danych literaturowych wynika, iż problem ten jest znamieny wśród pacjentów z NCHZJ i dotyczy wielu chorych, szczególnie po rozległych zabiegach i długim czasie trwania choroby. W wielu badaniach udokumentowano, że utrata masy ciała dotyczy 70-80% chorych hospitalizowanych oraz 20-40% chorych leczonych ambulatoryjnie.

Mechanizmy doprowadzające do stanu niedożywienia mogą być różne: zmniejszone spożycie (ból brzucha, leki, nudności), upośledzone wchłanianie substancji (zmniejszona powierzchnia absorpcyjna ze względu na stan zapalny, resekcja), zwiększona utrata jelitową (biegunka), stan nasilonego metabolizmu, czy wreszcie interakcje z lekami [75].

Valentini L i wsp. przeprowadzili prospektywne, kontrolowane wielośrodkowe badanie gdzie w grupie 94 pacjentów z ChLC i 50 pacjentów z WZJG oceniano stan odżywienia pacjentów na podstawie badania składu ciała, oceny siły mięśniowej. W pracy oceniano również jakość życia, pacjenci znajdowali się w okresie klinicznej remisji choroby. Otrzymane wyniki badań wykazały, że większość pacjentów z NCHZJ (74%) była dobrze odżywiona zgodnie ze wskaźnikami masy ciała i stężeniem albumin w surowicy krwi. Analiza składu ciała (metodą bioimpedancji) wykazała zmniejszenie masy komórek ciała (BCM – body mass cell), zarówno u pacjentów z ChLC jak i WZJG w porównaniu z grupą kontrolną. Siła mięśniowa również była obniżona i

skorelowana z BCM w porównaniu z grupą kontrolną. Zauważono również, że BCM była niższa u pacjentów z podwyższonym stężeniem białka CRP [190].

Opieka nad pacjentem z NCHZJ uległa zmianom w ciągu ostatnich lat w związku z nowymi metodami promocji zdrowia, ze szczególnym naciskiem na nadzór żywienia i edukacji pacjenta. Podkreśla się interdyscyplinarne podejście do chorób jelit obejmujące skupienie się zarówno nad immunologią jelit, stresem, jak również nadzorem dietetycznym pacjentów. Ważnym jest indywidualnie określony sposób żywienia, bowiem właściwa kompozycja diety a więc zapobieganie stanom niedożywienia i niedoborom składników odżywczych, wzmacnia organizm, jego zdolność do samoleczenia i regeneracji. Podsumowując wydaje się być zasadnym stosowanie do oceny stanu odżywienia pacjentów przewlekle chorych, w tym na NCHZJ, szerszego panelu badań, obejmujących badania biochemiczne, antropometryczne, jak również badanie składu ciała oraz ocenę siły mięśniowej.

Wszystkie czynniki biorące udział w patogenezie NCHZJ, a więc: czynniki zakaźne, alergiczne, dietetyczne, psychospołeczne, środowiskowe, mikrobiologiczne, naczyniowe, metaboliczne, genetyczne, wreszcie immunologiczne, są przez jednych badaczy krytykowane, inni zaś próbują je w swych badaniach klinicznych udowodnić. Możliwość integracji wszystkich tych elementów w spójną całość wyjaśnia wszystkie aspekty NCHZJ, mimo, że wciąż nie daje jednoznacznej odpowiedzi, zmienia podejście do terapii tych chorób, a co za tym idzie poprawia jakość życia chorych.

6. Wnioski

- Profil cytokin w surowicy chorych na ChLC odpowiada odpowiedzi Th1 (przy czym hamowanie procesu immunologicznego Th1 przez IL10 powoduje wzrost parametrów: HGB oraz HCT), natomiast u pacjentów z WZJG przeważa odpowiedź immunologiczna typu Th2 (wartość IL-4 jest wyższa niż w grupie kontrolnej); w grupie chorych z ChLC stwierdzono wyższe miano IL-2, IFN γ oraz TNF α w stosunku do grupy kontrolnej.
- U pacjentów z WZJG wykazano statystycznie istotną różnicę odsetka limfocytów Treg u chorych 0 a 2 stopniami zaawansowania choroby, co wskazuje, że brak hamowania odpowiedzi immunologicznej może być istotnym czynnikiem zaostżenia WZJG.
- Wykazano statystycznie istotną różnicę w stężeniu białka CRP między grupą pacjentów z ChLC i WZJG. U pacjentów z WZJG stężenie CRP rosło

wraz ze zwiększającym się stopniem zaawansowania choroby, co potwierdza, że stan zapalny koreluje ze stopniem zaawansowania choroby.

- W badanej populacji nie stwierdzono istotnych odchyleń w stanie odżywienia chorych z NCHZJ.

7. Streszczenie

Choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego należą do grupy nieswoistych chorób zapalnych jelit, chociaż te dwie choroby mają różną symptomatologię, łączy je wspólna, złożona wieloczynnikowa patogenezą, w której najistotniejszą rolę odgrywają czynniki genetyczne, środowiskowe oraz immunologiczne.

Nieswoiste choroby zapalne jelit rozwijają się u osób podatnych genetycznie, przy udziale czynników środowiskowych, co prowadzi do zaburzenia rozpoznawania antygenów mikroflory jelit przez układ immunologiczny, powodując w konsekwencji nadmiernie wyrażoną odpowiedź immunologiczną oraz uszkodzenie błony śluzowej jelit. Wzrost częstości występowania NCHZJ w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w obszarach o niskiej jak i wysokiej zachorowalności, wskazuje na silny wpływ czynnika środowiskowego, różnice rozpowszechniania choroby zależą od stylu życia, nawyków żywieniowych, występowania infekcji żołądkowo-jelitowych, jak również palenia tytoniu oraz stosowania niektórych grup leków. Etiologia tych jednostek chorobowych pozostaje niejasna, mechanizmy uszkodzenia tkanek wydają się być złożone, w związku z czym stanowią poważne wyzwanie kliniczne i terapeutyczne.

Celem pracy była:

- Ocena profilu wybranych cytokin Th1 i Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ) w zależności od intensywności procesu chorobowego, który oceniano za pomocą wskaźników zapalnych, klinicznego stopnia nasilenia choroby.
- Określenie odsetka limfocytów T regulatorowych (CD3+CD4+ CD25+) w surowicy krwi obwodowej chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna.
- Ocena stanu odżywienia pacjentów z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit.

Niniejsze badania o charakterze prospektywnym przeprowadzono u grupy 51 chorych na nieswoiste zapalenia jelit w wieku od 24 do 86 lat, z czego 24 osoby miały

rozpoznaną chorobę Leśniowskiego-Crohna, a 27 osób chorowało na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Badaniu zostali poddani pacjenci hospitalizowani w Katedrze Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki oraz Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupę kontrolną (n=15) stanowili zdrowi wolontariusze z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. Z badania wykluczono pacjentów: w wieku poniżej 18 roku życia, z niewydolnością nerek, niewydolnością wątroby, hiperbilirubinemią, zapaleniem trzustki, zaburzeniami hormonalnymi, chorobami alergicznymi, chorych przyjmujących leki neuroleptyczne lub/i przeciwdepresyjne. Wyniki badań poddano analizie statystycznej, której schemat przedstawiono na Rycinie 5 niniejszej pracy. Oceniając stężenie wybranych cytokin wykorzystano jako metodę badawczą cytometrię przepływową. Aktywność kliniczną obu jednostek chorobowych określano za pomocą wskaźnika aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (CDAI) oraz klinicznego wskaźnika aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wg Rachmilewicza, oraz klasyfikacji montrealskiej.

Na podstawie wyników badań sformułowano następujące wnioski:

- Profil cytokin w surowicy chorych na ChLC odpowiada odpowiedzi Th1 (przy czym hamowanie procesu immunologicznego Th1 przez IL10 powoduje wzrost parametrów: HGB oraz HCT), natomiast u pacjentów z WZJG przeważa odpowiedź immunologiczna typu Th2 (wartość IL-4 jest wyższa niż w grupie kontrolnej); w grupie chorych z ChLC stwierdzono wyższe miano IL-2, IFN γ oraz TNF α w stosunku do grupy kontrolnej.
- U pacjentów z WZJG wykazano statystycznie istotną różnicę odsetka limfocytów Treg u chorych 0 a 2 stopniami zaawansowania choroby, co wskazuje, że brak hamowania odpowiedzi immunologicznej może być istotnym czynnikiem zaostrzenia WZJG.
- Wykazano statystycznie istotną różnicę w stężeniu białka CRP między grupą pacjentów z ChLC i WZJG. U pacjentów z WZJG stężenie CRP rosło wraz ze zwiększającym się stopniem zaawansowania choroby, co potwierdza, że stan zapalny koreluje ze stopniem zaawansowania choroby.
- W badanej populacji nie stwierdzono istotnych odchyleń w stanie odżywienia chorych z NCHZJ.

8. Summary

Crohn's Disease (CD) and Ulcerative colitis (UC) belong to the group of non-specific inflammatory bowel diseases. Although symptomatology of these two diseases may be different, pathogenesis of both CD and UC is similar - genetic, environmental and immunological factors play an important role in the pathogenesis of IBD.

Non-specific inflammatory bowel disease can occur - in genetically susceptible individuals with the participation of environmental factors leading to an abnormal intestinal microflora antigen recognition by the immune system. This results in the over-expressed immune response leading to intestinal mucosal injury. Recent increase in the incidence of IBD both in areas of low and high prevalence indicates the strong influence of environmental factors. Prevalence of the disease can be linked to the sedentary lifestyle, inappropriate eating habits, increased incidence of gastrointestinal infections as well as smoking and drug use. Although etiology of these diseases remains unclear, mechanisms of tissue damage seem to be complex and remains a very serious clinical and therapeutic challenge for researchers.

The aims of this study involved:

- Assessment of the levels of selected cytokines Th1 and Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ) in relation to the intensity of the disease which was assessed by clinical indicators of inflammation and disease severity.
- Identification of Treg lymphocytes in peripheral blood serum of patients with CD and UC.
- Assessment of nutritional status in IBD patients.

This prospective study was performed on a group of 51 patients suffering from IBD; 24 individuals were diagnosed with Crohn Disease and 27 patients suffered from ulcerative colitis. Patients' age ranged from 24 to 86 years of age. Study was performed on patients hospitalized in the Department of Medicine, Metabolism and Nutrition and in the Department of Colorectal and General Surgery of the University of Medical Sciences in Poznan. The control group consisted of healthy volunteers from The Regional Blood Center in Poznan. The exclusion criteria were as follows: age under 18, renal and hepatic failure, hyperbilirubinemia, pancreatitis (both acute and chronic), endocrine disorders, allergic diseases and treatment with neuroleptics and/or antidepressants. Flow cytometry was used to measure concentrations of selected

cytokines. Crohn's Disease Activity Index (CDAI), Clinical Activity Index of Ulcerative Colitis by Rachmilewitz and Montreal Classification were used in order to assess clinical activity of CD and UC.

Based on the results the following conclusions were made:

- Serum cytokine profile in patients with CD correlates with Th1 response (where inhibition of the Th1 immune process at IL-10 causes elevation of HGB as well as HCT values), whereas in UC patients Th2 type of immunological response prevails (IL-4 value is higher than in the control group); in CD patient group higher titers of IL-2, IFN- γ as well as TNF- α were found as compared to the control group.
- In patients with UC a statistically significant difference was shown in percentage of Treg lymphocytes in patients with 0 and 2 degree of disease severity, which indicates that loss of inhibition of the immune response may be a significant factor in exacerbation of UC.
- Statistically significant difference was shown in the concentration of C-reactive protein (CRP) between the CD and UC patient groups. In patients with UC the concentration of CRP was increasing together with the increasing degree of disease severity, which proves that the inflammatory state correlates with the degree of disease severity.
- The abnormal nutritional status was not confirmed within the assessed group of patients with IBD, however it cannot be concluded that the problem with malnutrition doesn't occur in patients with both CD and UC.

9. Spis tabel

Tabela 1	Rola bakterii w przewlekłym nieswoistym zapaleniu jelit
Tabela 2	Czynniki infekcyjne w patogenezie IBD: dowody za i przeciw
Tabela 3	Rola cytokin i rodzajów komórek biorących udział w ich produkcji u pacjentów z IBD
Tabela 4	Klasyfikacja montrealaska choroby Leśniowskiego-Crohna
Tabela 5	Metoda obliczania wskaźnika CDAI
Tabela 6	Aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna na podstawie wartości wskaźnika CDAI

Tabela 7	Klasyfikacja montrealaska wrzodziejącego zapalenia jelita grubego
Tabela 8	Sposób wyznaczania wskaźnika Rachmilewita – CAI
Tabela 9	Różnice kliniczne między WZJG i ChLC
Tabela 10	Etiopatogenetyczne różnice między CU i CD
Tabela 11	Mechanizm działania wybranych leków biologicznych
Tabela 12	Średnia wieku w poszczególnych jednostkach chorobowych z podziałem na płeć
Tabela 13	Wykładniki laboratoryjne w badanej grupie chorych z ChLC (kolorem szarym zaznaczono parametry zgodne z rozkładem normalnym)
Tabela 14	Wykładniki laboratoryjne w badanej grupie chorych z WZJG (kolorem szarym zaznaczono parametry zgodne z rozkładem normalnym)
Tabela 15	Zależności stężenia cytokin między sobą (korelacje nieparametryczne rang Spearmana) w grupie ChLC
Tabela 16	Zależności stężenia cytokin między sobą (korelacje nieparametryczne rang Spearmana) w grupie WZJG
Tabela 17	Porównanie wybranych parametrów grupy badanej (L-C + WZJG 17A) z grupą kontrolną (17B)
Tabela 18	Parametry, które nie posiadały rozkładu normalnego porównane nieparametrycznym testem Manna – Whitney’a
Tabela 19	Porównanie wybranych parametrów grupy badanej (L-C 19A, WZJG 19B) i grupy kontrolnej 19C
Tabela 20	Parametry wykazujące istotną statystycznie różnicę porównano testem Kruskala – Wallisa
Tabela 21	Średnie wartości badanych parametrów w grupie pacjentów ChLC i WZJG, w zależności od stopnia zaawansowania choroby (kolorem szarym zaznaczono rozkład normalny)

10. Spis rycin

Rycina 1	Schemat leczenia WZJG
Rycina 2	Schemat leczenia ChLC
Rycina 3	Uzyskanie remisji w chorobie Crohna
Rycina 4	Uzyskanie remisji we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

- Rycina 5** Analiza cytometryczna limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD3+CD4+CD25high
- Rycina 6** Schemat analizy statystycznej wykonanej w pracy
- Rycina 7** Średnie wartości interleukin w grupie ChLC, WZJG i grupie kontrolnej
- Rycina 8** Średnie wartości IL-2, TNF α i INF γ w grupie ChLC, WZJG i grupie kontrolnej
- Rycina 9** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji dla stężenia IL2 z stężeniem białka w surowicy krwi (A) oraz IL2 z WBC (B) w grupie ChLC
- Rycina 10** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IL10 a HGB (A) oraz IL10 a HCT (B) w grupie ChLC
- Rycina 11** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między TNF α a HGB (A) oraz TNF α (B) a stężeniem białka w surowicy krwi w grupie ChLC
- Rycina 12** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IFN γ a HCT (A), IFN γ a stężeniem białka w surowicy krwi (B) oraz IFN γ a stężeniem albumin w surowicy krwi (C) w grupie ChLC
- Rycina 13** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między IL10 a WBC (A) oraz CD3 a CRP (B) w grupie WZJG
- Rycina 14** Wykres rozrzutu z współczynnikiem korelacji między CD25/CD4 a PLT w grupie WZJG
- Rycina 15** Średnie wartości OB w grupie L-C dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby
- Rycina 16** Średnie wartości parametrów dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby: MCH (A), PLT (B), białka (C), CD3 (D), CD25/CD4 (E)
- Rycina 17** Średnie wartości CD3 w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów 0 stopniem zaawansowania choroby
- Rycina 18** Średnie wartości CRP w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów z 1-wszym stopniem zaawansowania choroby
- Rycina 19** Średnie wartości WBC w grupie ChLC i WZJG dla pacjentów z 2-gim stopniem zaawansowania choroby

11. Piśmiennictwo

1. Agostini A, Filippini N, Cevolani D, Agati R, Leoni C, Tambasco R, Calabrese C, Rizzello F, Gionchetti P, Ercolani M, Leonardi M, Campieri M. Brain functional changes in patients with ulcerative colitis: A functional magnetic resonance imaging study on emotional processing. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Aug;17(8):1769-77. doi: 10.1002/ibd.21549. Epub 2010 Nov 15.
2. Ahirwar DK, Kesarwani P, Singh R, Ghoshal UC, Mittal RD. Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease in Northern India. *J Gastrointest Cancer.* 2011 Jan 20. [Epub ahead of print]
3. Allez M, Lémann M. Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010 Jun 7;16(21):2626-32.
4. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Østergaard M, Jacobsen BA, Tjønneland A, Krarup HB, Vogel U. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohn's disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet.* 2010 May 28;11:82
5. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2003; 124 (1): 40-6
6. Andoh A, Bamba T, Sasaki M. Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. *J Parent Ent Nutr.* 1999; 20: 338-43
7. Andoh A, Yagi Y, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008 Sep 7; 14(33): 5154-61
8. Arora SK. Analysis of intracellular cytokines using flow cytometry. *Methods Cell Sci.* 2002; 24: 37-40.
9. Arvikar SL, Fisher MC. Inflammatory bowel disease associated arthropathy. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2011 Jun 28. [Epub ahead of print]
10. Banasiewicz T, Borycka-Kiciak K, Dobrowolska-Zachwieja A, Friediger J, Kiciak A, Krokowicz P, Małecka-Panas E, Pietrzak P, Rydzewska G, Tarnowski W, Zabielski R. Kliniczne aspekty zastosowania kwasu masłowego w postępowaniu dietetycznym w chorobach jelit. Clinical aspects of sodium butyrate application in dietary treatment of bowel diseases. *Przegląd Gastroenterologiczny.* 2010; 5(6): 329-334
11. Banerjee A.K., Sir Samuel Wilks: a founding father of clinical science. *Journal of the Royal Society of Medicine* Volume 84 January 1991: 44-45
12. Baran J. Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometriach i ich zastosowanie. *Postępy biologii komórki.* Tom 35 2008, Suplement nr 24 (3-15)

13. Bargiggia S, Maconi G, Elli M, Molteni P, Ardizzone S, Parente F, Todaro I, Greco S, Manzionna G, Porro GB. Sonographic prevalence of liver steatosis and biliary tract stones in patients with inflammatory bowel disease: study of 511 subjects at single center. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 36: 417-420
14. Bariol C, Meagher AP, Vickers CR, Byrnes DJ, Edwards PD, Hing M, Wettstein AR, Field A. Early studies on the safety and efficacy of thalidomide for symptomatic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 135-139
15. Bartnik W. Choroby układu pokarmowego. Choroby Wewnętrzne. 2005. Wydanie I. Tom I. 2005; pp. 816-826
16. Bartnik W. Inflammatory bowel disease – Polish contribution. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003, 54, S3, 205-210
17. Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Gastroenterologia Polska.* 2007, 14, 1: 3-13
18. Bartnik W., Wejman J. Atlas kliniczno-patologiczny nieswoistych chorób zapalnych jelit. Poznań 2011. Termedia Wydawnictwa medyczne.
19. Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, De Simone C, Carbo A, Shaykhutdinov R, Jobin C, Arthur JC, Corl BA, Vogel H, Storr M, Hontecillas R. Probiotic Bacteria Produce Conjugated Linoleic Acid Locally in the Gut That Targets Macrophage PPAR γ to Suppress Colitis. *PLoS One.* 2012; 7(2): e31238. Epub 2012 Feb 21
20. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369: 1641-1657
21. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2009 Feb; 106(8): 123-33. Epub 2009 Feb 20. Review.
22. Bergquist A, Ekbon A, Olsson R, Kornfeldt D, Loof L, Danielsson A, Hultcrantz R, Lindgren S, Prytz H, Sandberg-Gretzen H, Almer S, Granath F, Broome U. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 2002; 36: 321-327
23. Bernstein Ch, Blanchard J, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96 (4): 1116-1122
24. Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, Geary R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malferteiner, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 112-124

25. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10: 848-859
26. Bojarski Ch. Malignant Transformation in Inflammatory Bowel Disease: Prevention, Surveillance and Treatment - New Techniques in Endoscopy. *Dig Dis.* 2009;27(4):571-5. Epub 2009 Nov 4. Review.
27. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2003; 124: 521-536
28. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Dovepress Journal.* February 2009; 3: 77 – 97
29. Bruining DH, Loftus EV Jr. Technology Insight: new techniques for imaging the gut in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008 Mar;5(3):154-61. Epub 2008 Jan 22. Review.
30. Buchner A, Iwańczak F. Etiopatogeneza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Nowa Ped.* 2002; 30(3)
31. Budzyńska A. Znaczenie endoskopii w diagnostyce i postępowaniu terapeutycznym u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Gastroenterologia Polska.* 2006; 13: 393-398
32. Burchardt D, Machowska L, Derwich K, Samara H, Dworacki G. Cytometria przepływowa – możliwości zastosowania w diagnostyce klinicznej zmian w obrębie jamy ustnej. *Nowiny Lekarskie* 2008, 77, 4, 324-329
33. Całkosiński I , Dobrzyński M , Całkosińska M , Seweryn E , Bronowicka-Szydełko A , Dzierżba K , Ceremuga I , Gamian A. Charakterystyka odczynu zapalnego. *Postepy Hig Med Dosw. (online),* 2009; 63: 395-408
34. Coelho A, Souto MI, Cardoso CR, Salgado DR, Schmal TR, Waddington Cruz M, de Souza Papi JA. Long-term thalidomide use in refractory cutaneous lesions of lupus erythematosus: a 65 series of Brazilian patients. *Lupus* 2005; 14: 434-439
35. Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 Suppl 1: I107-I113
36. Cui-Fang Zheng, Jia-Hua Xu, Ying Huang, Ying-Kit Leung. Treatment of pediatric refractory Crohn's disease with thalidomide. *World J Gastroenterol.* 2011 March 14; 17(10): 1286-1291
37. Cummings JRF, Keshav S, Travis SPL. Medical management of Crohn's disease, *BMJ.* 2008;336:1062-6
38. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4082-4085

39. D'Haens G, Baert F, van Assche G. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*. 2008;371:660-67
40. Dąbrowska A, Słotwinski R, Kędziora S. Probiotyki – panaceum czy placebo? Probiotics – panacea or placebo? *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2010; 5(6): 321-328
41. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 14;12(30):4807-12
42. De Cruz P, Prideaux L, Wagner J, Ng SC, McSweeney C, Kirkwood C, Morrison M, Kamm MA. Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Feb;18(2):372-90. doi: 10.1002/ibd.21751. Epub 2011 May 20
43. de Saussure P, Clerson P, Prost PL, Truong Tan N, Bouhnik Y, Gil-Rch. Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007; 31: 493-497
44. De Vos M. Review article: joint involvement in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20: 36-42
45. Denese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2005; 11 (46): 7227-7236
46. Direskeneli H, Ergun T, Yavuz S, Hamuryudan V, Eksio-glu-Demiralp E. Thalidomide has both anti-inflammatory and regulatory effects in Behcet's disease. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 373-375
47. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, Man HW, Chen R, Muller GW, Stirling D, Dalgleish AG. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer* 2002; 87: 1166-1172
48. Dredge K, Marriott JB, Dalgleish AG. Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 425-437
49. Drela N. Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej - zastosowanie i problemy. *Post Biol Kom*. 2002; 28: 129.146.
50. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 1995; 102: 448-455
51. Dunlap CL, Friesen CA, Shultz R. Chronic stomatitis: an early sign of Crohn's disease. *J Am Dent Assoc*. 1997; 128: 347-348
52. Duricova D., Pedersen N., Elkjaer M., Gamborg M., Munkholm P., Jess T. Overall and causa-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studiem. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 347-353

53. Eder P, Stawczyk K, Krela-Kaźmierczak I, Linke K. Wybrane markery stanu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit. *Gastroenterologia Polska* 2007, 14(6): 429-431
54. Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999; 117: 1271-1277
55. Epstein D, Watermeyer G, Kirsch R. The diagnosis and management of Crohn's disease in populations with high-risk rates for tuberculosis – review article. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25: 1373-1388
56. Fan Y, Meng MQ, Li B. 3D reconstruction of wireless capsule endoscopy images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010;2010:5149-52
57. Fazio VW, Aufses AH. Evolution of surgery for Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum.* 1999, 42, 979-988
58. Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 May; 6(5): 297-305. Review.
59. Ferguson A. Ulcerative colitis and Crohn's disease. *BMJ.* 1994,309,355-6
60. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology,* 1998, 115, 182-205
61. Fireman Z, Osipov A, Kivity S, Kopelman Y, Sternberg A, Lazarov E, Fireman E. The use of induced sputum in the assessment of pulmonary involvement in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 377-381
62. Franchimont N, Putzeys V, Collette J, Vermeire S, Rutgeerts P, de Vos M, van Gossum A, Franchimont D, Fiasse R, Pelckmans P, Malaise M, Belaiche J, Louis E. Rapid improvement of bone metabolism after infliximab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20: 607-614.
63. Fyderek K, Strus M, Kowalska-Duplaga K, Gosiewski T, Wędrychowicz A, Jedynek-Wąsowicz U, Sładek M, Pieczarkowski S, Adamski P, Kochan P, Heczko PB. Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009 November 14; 15(42): 5287-5294
64. Glocker EO, Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *N Engl J Med.* 2010, 361; 21: 2033-2045
65. Goldstein JI, Kominsky DJ, Jacobson N, Bowers B, Regalia K, Austin GL, Yousefi M, Falta MT, Fontenot AP, Gerich ME, Golden-Mason L, Colgan SP. Defective leukocyte

- GM-CSF receptor (CD116) expression and function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;141:208-216
66. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. i wsp.: *Immunologia*. PWN, Warszawa, 2007
 67. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: Study of 700 patients. *Medicine*. 1976; 55: 401-12
 68. Grzybowska K. Udział układu immunologicznego w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Nowa Pediatria* 1/2003, s. 81-84
 69. Grzymisławski M. Powikłania metaboliczne choroby Leśniowskiego-Crohna. *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2006; 1(2): 61-64
 70. Hala E Hamouda, Soha S Zakaria, Saber A Ismail, Mahmoud A Khedr, Wael W Mayah. p53 antibodies, metallothioneins, and oxidative stress markers in chronic ulcerative colitis with dysplasia. *World J Gastroenterol* 2011 May 21; 17(19): 2417-2423
 71. Halme S, Meurman JH, Laine P, von Smitten K, Syrjanen S, Lindqvist C, Strand-Pettinen I. Oral findings in patients with active Crohn's disease. *Oral Surg Oral Med. Oral pathol.* 1993; 76: 175-181
 72. Hammer HF. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2011;29(6):550-3. Epub 2011 Dec 12
 73. Hanauer S. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12 Suppl 1:S3-9
 74. Harpaz N, Polydorides AD. Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: pathology, clinical implications, and pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jun; 134(6): 876-95.
 75. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2009 Jun 7;15(21):2570-8.
 76. Harty S, Fleming P, Rowland M, Crushell E, McDermott M, Drumm B, Bourke B. A prospective study of the oral manifestations of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3: 886-891
 77. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, Moum B; IBSEN Study Group. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut*. 2008 Nov;57(11):1518-23. Epub 2008 Jun 19.
 78. Hlavaty T, Huorka M, Koller T, Zita P, Kresanova E, Rychly B, Toth J. Colorectal cancer screening in patients with ulcerative and Crohn's colitis with use of colonoscopy, chromoendoscopy and confocal endomicroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011 May 19. [Epub ahead of print]
 79. Hoffmann RM, Kruis W. Rare extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004; 10: 140-147

80. Hosokawa T, Kusugami K, Ina K, Ando T, Shinoda M, Imada A, Ohsuga M, Sakai T, Matsuura T, Ito K, Kaneshiro K. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Oct;14(10):987-96
81. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol.* 2011 Apr;106(4):563-73
82. Hyphantis T, Antoniou K, Tomenson B, Tsianos E, Mavreas V, Creed F. Is the personality characteristic "impulsive sensation seeking" correlated to differences in current smoking between ulcerative colitis and Crohn's disease patients? *Gen Hosp Psychiatry.* 2010 Jan-Feb;32(1):57-65. Epub 2009 Oct 1.
83. Jałocha I, Gabryś MS. Wpływ nieswoistych zapaleń jelit na rozrodczość. *Gastroenterologia Polska* 2012, 17(5): 333-336
84. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology.* New York and London, Garland Science 2001
85. Januszewicz W, Kokot F (red zb.). *Interna.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2004
86. Jiménez R, Ramírez R, Carracedo J, Agüera M, Navarro D, Santamaría R, Pérez R, Del Castillo D, Aljama P. Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine.* 2005; 32(1):45-50
87. Kane S, Stone LJ, Ehrenpreis E. Thalidomide as "salvage" therapy for patients with delayed hypersensitivity response to infliximab: a case series. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 149-150
88. Kantorski J. Podstawy cytometrii przepływowej. *Cent Eur J Immunol.* 1996, 21, S87-S93
89. Kaplan G, Thomas S, Fierer DS, Mulligan K, Haslett PA, Fessel WJ, Smith LG, Kook KA, Stirling D, Schambelan M. Thalidomide for the treatment of AIDS-associated wasting. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1345-1355
90. Kawiak J. *Cytometria przepływowa – badania immunocytometryczne.* ed 2. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN, 1999.
91. Kiesslich R, Neurath MF. What new endoscopic imaging modalities will become important in the diagnosis of IBD? *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Oct;14 Suppl 2:S172-6. Review. No abstract available. Erratum in: *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Sep;15(9):1438-47
92. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J. Gastroentero.* 2001, 7(2),175-184
93. Kohut M, Hartleb M, Hartleb T. Znaczenie surowiczych stężeń cytokin pro- i przeciwzapalnych w identyfikacji chorych na chorobę Crohna. *Pol. Merk. Lek.,* 2010, XXIX, 171, 169

94. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol.* 2011 Dec; 62(6): 591-9
95. Konturek SJ (red): *Gastroenterologia i hepatologia kliniczna.* PZWL Warszawa 2006
96. Korobowicz A. Biologia czynnika martwicy nowotworów typu alfa (TNF alfa). *Pol Merk Lek.* 2006; XXI: 358
97. Korzenik JR. Past and Current Theories of Etiology of IBD: Toothpaste, Worms, and Refrigerators. *Journal of Clinical Gastroenterology: April 2005 – Volume 39 –Issue 4 – pp S59-S65*
98. Kroser J, Srinivasan R. Drug therapy of inflammatory bowel disease in fertile women. *Am J Gastroenterol.* 2006 Dec;101(12 Suppl):S633-9
99. Kruis W, Schütz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11: 853-8
100. Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. Appendectomy, tonsillectomy and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *J Epidemiol Community Health.* 2002; 56: 551-554
101. Lakatos L, Pandur T, Gyula D, Balogh Z, Kuronya P, Tollas A, Lakatos PL. Association of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary with disease phenotype: results of a 25-years follow-up study. *World J Gastroenterol.* 2003; 9 (10): 2300-2307
102. Lakatos PL, Horvath HC, Zubek L, Pak G, Pak P, Fuszek P, Nagypal A, Papp J. Double-balloon endoscopy for small intestinal disease: a single-center experience in Hungary. *Med Sci Monit.* 2010 Feb 26;16(3):MT22-27.
103. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 6102-6108
104. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol.* 2008 Jan;103(1):162-9. Epub 2007 Oct 4
105. Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, Bréant C, Mathivet T, Larrivée B, Thomas JL, Arthur HM, Westermann CJ, Disch F, Mager JJ, Snijder RJ, Eichmann A, Mummery CL. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* 2010; 16: 420-428

106. Leite MR, Santos SS, Lyra AC, Mota J, Santana GO. Thalidomide induces mucosal healing in Crohn's disease: Case report. *World J Gastroenterol* 2011 December 7; 17(45): 5028-2031
107. Levine D, Reid B. Endoscopic biopsy technique for acquiring larger mucosal samples. *Gastrointest Endosc.* 1991; 37: 332-337
108. Lichtenstein GR. Chemokines and cytokines in inflammatory bowel disease and their application to disease treatment. *Curr Opin Gastroenterol.* 2000; 16(1): 83-88
109. Lidar M, Langevitz P, Shoenfeld Y. The Role of Infection in Inflammatory Bowel Disease: Initiation, Exacerbation and Protection. *IMAJ VOL 11* 2009; 9: September: 558-563
110. Lo SK, Fleming KA, Chapman RW. Prevalence of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis an alkaline phosphatase technique. *Gut.* 1992; 33: 1370-1375
111. Loddenkemper C. Diagnostic standards in the pathology of inflammatory bowel disease. *Dig Dis.* 2009; 27(4): 576-83. Epub 2009 Nov 4. Review
112. Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Offord KP, Melton LJ. Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 1996; 110: 432-440
113. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004; 126: 1505-1517
114. Lubecka-Macura A, Kohut M. Nadrodzina TNF – mechanizmy działania, funkcje biologiczne i możliwości terapeutyczne. TNF superfamily – mechanisms of action, biological functions and therapeutic possibilities. *Przegląd Gastroenterologiczny.* 2010; 5(6): 303-309
115. Mach T, Szczeklik K, Garlicka M, Owczarek D. Owrzodzenie w obrębie jamy ustnej u chorego z aktywną chorobą Leśniowskiego-Crohna – opis przypadku. *Przegląd Gastroenterologiczny.* 2007; 2 (4): 210-213
116. Makharia GK. Understanding and Treating Abdominal Pain and Spasms in Organic Gastrointestinal Diseases: Inflammatory Bowel Disease and Biliary Diseases. *J Clin Gastroenterol.* 2011 Aug;45 Proceedings from the Pan-European Conference on Irritable Bowel Syndrome December 10, 2010 Vienna, Austria:S89-S93.
117. Malins TJ, Wilson A, Ward-Booth RP. Recurrent buccal space abscesses: a complication of Crohn's disease. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol.* 1991; 72: 19-21
118. Mangat BK, Evaschen C, Lee T, Yoshida EM, Salh B. Ethnic variation in the annual rates of adult inflammatory bowel disease in hospitalized patients in Vancouver, British Columbia. *Can J Gastroenterol.* 2011 Feb;25(2):73-7.

119. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(suppl):430S–6S.
120. Maśliński W. Sieć cytokin w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. MP OnLine. Data utworzenia: 01.09.2000. Ostatnia modyfikacja: 30.04.2007
121. Maunoury V, Savoye G, Bourreille A, Bouhnik Y, Jarry M, Sacher-Huvelin S, Ben Soussan E, Lerebours E, Galmiche JP, Colombel JF. Value of wireless capsule endoscopy in patients with indeterminate colitis (inflammatory bowel disease type unclassified). *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Feb;13(2):152-155.
122. McClane S, Rombeau J. Cytokines and inflammatory bowel disease: a review. *J Parent Enteral Nutr.* 1999; 23(5 Suppl): S20-S24
123. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, Osterode W, Tillinger W, Feichtenschlager T, Grisar J, Machold K, Scholz S, Vogelsang H, Novacek G. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut.* 2004; 53: 542-548
124. Mielants H, De Vos M, Cuvelier C, Veys EM. The role of gut inflammation in the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Acta Clinica Belgica.* 1996; 51: 340-349
125. Mielants H, Veys E, De Vos M, Cuvelier C, Goemaere S, De Clercq L, Schattevan L, Elewaut D. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. L Clinical aspects. *J Rheumatol.* 1995; 22: 2266-2272
126. Nam SY, Kim BC, Ryu KH, Park BJ. Prevalence and risk factors of irritable bowel syndrome in healthy screenee undergoing colonoscopy and laboratory tests. *J Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jan; 16(1): 47-51. Epub 2010 Jan 31.
127. Neubauer K, Paradowski L. Leczenie podtrzymujące remisję w nieswoistych zapaleniach jelit. Treatment for the maintenance of remission in inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia Polska* 2010, 17(2): 129-132
128. NG SC, Kamm MA. New drug formulations, chemical entities and therapeutic approaches for the management of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 28, 815-829
129. Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, Dassopoulos T, Schumm P, Gregory FJ, Griffiths AM, Hanauer SB, Hanson J, Harris ML, Kane SV, Orkwis HK, Lahaie R, Oliva-Hemker M, Pare P, Wild GE, Rioux JD, Yang H, Duerr RH, Cho JH, Steinhardt AH, Brant SR, Silverberg MS. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of large North American cohort. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101: 1012-1023
130. Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 2000, 95, 359-367

131. Nunes T, Fiorino G, Danese S, Sans M. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: Is it genes or environment? *World J Gastroenterol*. 2011 Jun 14;17(22):2715-22
132. O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Feb 12. [Epub ahead of print]
133. Odagi I, Kato T, Imazu H, Kaise M, Omar S, Tajiri H. Examination of normal intestine using confocal endomicroscopy. *Gastroenterol Hepatol*. 2007 May;22(5):658-62
134. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Żurkowski A, Glinianowicz M. Rola czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) w kontroli metabolizmu. *Wiadomości lekarskie* 2005; 58 (11-12): 670-674
135. Orchard TR, Watenabe K, Nakamura S, Higuchi K, Arakawa T. Extraintestinal complications in patients with ulcerative colitis. *Nippon Rinsho*. 2005; 63: 874-878
136. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut*. 1998; 42: 387-391
137. Owczarek D, Cibor D, Mach T. Rola interleukin w terapii nieswoistych zapaleń jelit. Role of interleukins in therapy of inflammatory bowel diseases. *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2008; 3(5): 232-236
138. Palm O, Moum B, Ongre A, Gran JT. Prevalence of ankylosis spondylitis and Rother spodyloarthropathies among patients with inflammatory bowel disease: a population study (the IBSEN study). *J Rheumatol*. 2002; 29: 511-515
139. Panaccione R, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan B, Schreiber S, Ghosh S. Treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 28, 674-688
140. Papaioannou A, Giangregorio L, Kvern B, Boulos P, Ioannidis G, Adachi JD. The osteoporosis care gap in Canada. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2004; 5: 11
141. Paradowska A. Oral cavity at ulcerative colitis – preliminary study. *Dent Med Prob*. 2008; 45 (4): 382-385
142. Paradowski L, Neubauer K, Reszczyńska M, Manelska M. Zmiany w konsensusie ECCO 2010 dotyczącym postępowania w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Changes in ECCO 2010 consensus on the management of Crohn's disease. *Gastroenterologia Polska* 2010, 17(2): 123-126
143. Pariente B, Mocan I, Camus M, Dutertre CA, Ettersperger J, Cattan P, Gornet JM, Dulphy N, Charron D, Lémann M, Toubert A, Allez M. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2011 Jul; 141(1):217-226

144. Parry SD, Baarbatzas C, Peel ET, Barton JR. Sulphasalazine and lung toxicity. *Eur Respir J.* 2002; 19: 756-764
145. Paul G, Khare V, Gasche C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest.* 2012 Jan;42(1):95-109. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02552.x. Epub 2011 Jun 1
146. Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sanborn W J, Colombel JF. Crohn's disease: Beyond antagonists of tumour necrosis factor. *Lancet.* 2008;372:67-81
147. Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep.* 2011 May-Jun; 63(3): 629-42
148. Pittock S, Drumm B, Fleming P, McDermott M, Imrie C, Flint S, Bourke B. The oral cavity in Crohn's disease. *J Pediatr.* 2001; 138: 767-771
149. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002 Aug 8;347(6):417-29.
150. Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemona H. Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. The cytokines in inflammatory bowel disease. *Postępy Hig Med. Dosw.* 2009; 63: 389-394
151. Radcliff G, Jaroszewski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 1998; 91: 1.24.
152. Raddatz D, Backemühl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17: 547-557
153. Radwan P, Radwan-Kwiatek K, Skrzydło-Radomańska B, Rydzewska G. Niedokrwistość w nieswoistych zapaleniach jelit – etiopatogeneza, rozpoznawanie i leczenie. Anaemia in inflammatory bowe disease – aetiopathogenesis, diagnosis and management. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2010; 5(6): 315-320
154. Rasmussen HH, Fallingorg JF., Mortensen PB, Vyberg M, Tage-Jensen U, Rasmussen SN. Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1997; 32: 604-610
155. Rodriguez-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 5560-5570
156. Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in neoterminal ileum. *Lancet.* 1991; 338: 771-774
157. Rydzewska G. Choroba Leśniowskiego – Crohna – 100 lat diagnostyki i terapii. *Termedia.* 2008, 23-36
158. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 699-703

159. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008 July 21; 14(27): 4280-4288
160. Sartor RB. Mechanism of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006, 3, 390-407
161. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008; 134: 577-594
162. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1620-1633
163. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006, 55, 749-753
164. Schreyer AG, Seitz J, Feuerbach S, Rogler G, Herfarth H. Modern imaging using computer tomography and magnetic resonance imaging for inflammatory bowel disease (IBD) AU1. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Jan;10(1):45-54. Review.
165. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Matreau M, Jian R, Doré J. Alternations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of colon. *Gut*. 2003; 52: 237-242
166. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1998; 66: 5224-5231
167. Shanahan F. Crohn's disease. *The Lancet*. Volume 359, Issue 9300, Pages 62 - 69, January 5, 2002
168. Shao LM, Chen MY, Chen QY, Cai JT. Meta-analysis: the efficacy and safety of certolizumab pegol in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 29, 605-614
169. Silverstein FE, Tygat GN. Atlas, Jelito grube II: choroby zapalne i zakaźne. *Endoskopia przewodu pokarmowego*. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 1998; 293-332
170. Sohrabpour AA, Malekzadeh R, Keshavarzian A. Current therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(33): 3668-83
171. Sokol H, Vasquez N, Hoyeau-Idrissi N, Seksik P, Beaugerie L, Lavergne-Slove A, Pochart P, Marteau P. Crypt abscess-associated microbiota in inflammatory bowel disease and acute self-limited colitis. *World J Gastroenterol*. 2010 Feb 7;16(5):583-7
172. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Aug;11(8):707-12
173. Stanisz A. *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach medycyny*. Tom I. Statystyki podstawowe. Kraków 2006.

174. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;7(11):599-610. Epub 2010 Oct 5
175. Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf*. 2000; 23: 429-448
176. Stricker T, Braegger CP. Images in clinical medicine. Oral manifestations of Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1644-1647
177. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1765-1767
178. Su CG, Judge TA, Lichtenstein GR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*. 2002; 31: 307-327
179. Suh Ch, Lee J, Lee Ch, Song Ch, Lee CW, Kim WH, Lee SK. Arthritic manifestations of inflammatory bowel disease. *J Korean Med. Sci*. 1998; 13 (1): 39-43
180. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A., Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002; 122 (1): 44-54
181. Swora E, Samborski P, Raniszewska M, Marcinkowska E, Grzymisławski M. Leczenie biologiczne nieswoistych chorób jelit. *Nowiny Lekarskie* 2009, 78, 3-4, 231-233
182. Szajewska H, Horvath A, Dziechciarz P. Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit – przegląd systematyczny. *Pediatrics Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*. 2007; 9 (4): 266-275
183. Szczeklik A. Choroby wewnętrzne tom I. *Medycyna Praktyczna*. Kraków 2005
184. Ślebioda Z, Szponar E. Ocena stanu błony śluzowej jamy ustnej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna – doniesienie wstępne. *DENTAL FORUM /2/2009/XXXVII*. http://www.dentalforum.amp.edu.pl/download/2009_02/DF_2009_02_045.pdf
185. Terjung B, Worman HJ. Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001; 15: 629-642
186. The history of IBD. <http://web.uct.ac.za/depts/git/ibd/history.htm>
187. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, Øresland T, Bemelman WA, Chowers Y, Colombel JF, O'Haens G, Ghosh S, Marteau P, Kruis W, McC Mortensen NJ, Penninckx F, Gassull M, for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO): European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2008; 2: 24-62.
188. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, Øresland T, Chowers Y, Forbes A, O'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel JF, Gioncheni P, Bouhnik Y, Turet E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ, for the European Crohn's and Cohtis

- Organisation (ECCO): European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Gut*. 2006; 55 (Suppl.1): i16-i35
189. Tsampalieros A, Griffiths AM, Barrowman N, Mack DR. Use of C-Reactive Protein in Children with Newly Diagnosed Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr*. 2011 Jun 4. [Epub ahead of print]
 190. Valentini L, Schaper L, Buning C, Hengstermann S, Koernicke T, Tillinger W, Guglielmi FW, Norman K, Buhner S, Ockenga J, Pirlich M, Lochs H. Malnutrition and impaired muscle strength in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis in remission. *Nutrition*. 2008 Jul-Aug;24(7-8):694-702. Epub 2008 May 21
 191. van de Donk NW, Kröger N, Hegenbart U, Corradini P, San Miguel JF, Goldschmidt H, Perez-Simon JA, Zijlmans M, Raymakers RA, Montefusco V, Ayuk FA, van Oers MH, Nagler A, Verdonck LF, Lokhorst HM. Remarkable activity of novel agents bortezomib and thalidomide in patients not responding to donor lymphocyte infusions following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2006; 107: 3415-3416
 192. van Staa TP, Cooper C, Brusse LS, Leufkens H, Javaid MK, Arden NK. Inflammatory bowel disease and the risk of fracture. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1591-1597
 193. Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H, Zeldis JB, Targan SR. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 1278-1287
 194. Veloso FT, Carvacho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol*. 1996; 23: 29-34
 195. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):661-5.
 196. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Role of genetics in prediction of disease course and response to therapy. *World J Gastroenterol*. 2010 June 7; 16(21): 2609–2615.
 197. Vestergaard P. Prevalence and pathogenesis of osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Minerva Med*. 2004; 95: 469-480
 198. Wierzbicki M, Brzezińska-Błaszczyk E. Rola komórek tucznych w rozwoju przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit. The role of mast cells in the development of inflammatory bowel diseases. *Postępy Hig Med. Dosw*. 2008; 62: 642-650
 199. Woźniak-Stolarska B, Sajewicz Z, Błachut K. Stężenie interleukiny 10 w surowicy krwi w nieswoistych zapaleniach jelit. *Adv. Clin. Exp. Med*. 2003, 12, 6, 717–721
 200. Wróbel K. Objawy dermatologiczne w chorobach przewodu pokarmowego. *Przewodnik Lekarski*. 2003; 6 (6): 84-92

201. Wultańska D, Banaszekiewicz A, Radzikowski A, Obuch-Woszczatyński P, Pituch H, Łuczak M, Młynarczyk G. Nawracające zakażenie *Clostridium difficile* u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit – badanie pilotażowe. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2009, 11, 1, 27-31
202. Yamamoto-Furusho JK. Genetic factor associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 5594-5597
203. Zagórowicz E, Albrecht P, Bartnik W, Butruk E, Czkwianianc E, Dobrowolska-Zachwieja A, Durko Ł, Ferenc M, Janiak M, Jaroszewicz-Heigelmann H, Kierkuś J, Korniak J, Kłopotcka M, Kucharski M, Mach T, Meder A, Ostrowski J, Pelczarski M, Radwan P, Rawa T, Reguta J, Romatowski J, Rostowski M, Rydzewska G, Sładek M, Staroń R, Starzyńska T, Świątkowski M, Talar-Wojnarowska R, Tomecki R, Wiśniewska-Jarosinska M, Wypych J. Rekomendacje Sekcji Jelitowej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące amino salicylanów we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego oraz dotyczące chemoprewencji raka jelita grubego w tej chorobie. *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy.* Rok 2010, tom2, numer2, strony 41-49
204. Zawadzka P, Hrycaj P. Atropatie towarzyszące nieswoistym zapaleniom jelit. *Reumatologia.* 2007; 45 (3): 148-153
205. Zmora O, Khaikin M, Pishori T, Pikarsky A, Dinnewitzer A, Weiss EG, Nogueras JJ, Wexner SD. Should ileoanal pouch surgery be staged for patients with mucosal ulcerative colitis on immunosuppressives? *Int J Colorectal Dis.* (2007) 22:289-292
206. Zuba-Surma E, Kucia M, Ratajczak MZ. Technologia IMAGESTREAM – krok dalej niż cytometria przepływowa. *Postępy biologii komórki* Tom 34 2007 nr 2 361-376
207. Żabka A, Mazur B, Karczewska K, Dyduch A. Stężenie IL-10 i IL-13 u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2007, 9, 2, 105-107