

**lek. med. Marcin Nelke**

**Genetyczna i kliniczna charakterystyka chorych z  
wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego**

**Promotor: dr hab. n. med. inż. Andrzej Pławski, prof. nadzw.**

**Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
W Poznaniu**

**Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. Piotr Krowicz**

Poznań 2013

## SPIS TREŚCI

I. Wstęp	5
1. Nieswoiste zapalenia jelit	5
1.1. Etiologia i patogenezą nieswoistych zapaleń jelit	5
1.1.1. Czynniki genetyczne	5
1.1.2. Czynniki środowiskowe	6
1.1.3. Czynniki immunologiczne	6
2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	7
2.1. Definicja	7
2.2. Rys historyczny	7
2.3. Epidemiologia	7
2.4. Klasyfikacja montrealaska wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	8
2.5. Objawy i przebieg kliniczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	8
2.5.1. Objawy choroby i powikłania jelitowe	9
2.5.2. Objawy pozajelitowe	11
2.5.3. Badania dodatkowe, diagnostyka	12
2.6. Leczenie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	14
2.6.1. Leczenie farmakologiczne	14
2.6.1.1. Preparaty kwasu 5-ASA	14
2.6.1.2. Kortykosteroidy	14
2.6.1.3. Leki immunosupresyjne	15
2.6.1.4. Leczenie biologiczne	15
2.6.1.5. Antybiotyki	15
2.6.1.6. Probiotyki	15
2.6.1.7. Inne	15
2.6.2. Leczenie operacyjne	16
2.6.2.1. Wskazania do leczenia operacyjnego	16
2.6.2.2. Techniki operacyjne	17
2.6.2.3. Powikłania leczenia operacyjnego	19
2.7. Genetyczne podłoże wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	20
2.7.1. Gen <i>NOD2</i>	20
2.7.2. Gen <i>HPGD</i> – charakterystyka i funkcja	20
2.7.3. Warianty polimorfizmów genów <i>SLC22A4</i> i <i>SLC22A5</i>	21
II. Cel i założenia pracy	22
III. Materiał i metody	23
1. Grupa badana	23
2. Grupa kontrolna	23

3. Analiza molekularna	23
4. Statystyka	37
IV. Wyniki	38
1. Dane populacyjne	38
1.1. Płeć i wiek postawionej diagnozy	38
1.2. Leczenie operacyjne	39
2. Dane kliniczne	42
2.1. Klasyfikacja Montrealska	42
2.2. DAI Score	43
2.3. Powikłania pozajelitowe	43
2.4. Nowotwory	43
2.5. Leczenie operacyjne	44
3. Badania molekularne	47
3.1. Badanie molekularne genu <i>NOD2</i>	47
3.1.1. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.3020insC	47
3.1.2. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.802C>T	51
3.1.3. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.2722G>C	56
3.1.4. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.2104C>T	61
3.2. Badanie molekularne genów <i>SLC22A4</i> i <i>SLC22A5</i>	68
3.2.1. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.1-207G/C w genie <i>SLC22A4</i>	68
3.2.2. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.1507C/T w genie <i>SLC22A5</i>	73
3.3. Analiza molekularna genu <i>HPGD</i>	80
V. Dyskusja	95
VI. Wnioski	103
VII. Streszczenie	104
VIII. Summary	106
IX. Wykaz tabel i rycin	108
X. Piśmiennictwo	112

## WYKAZ SKRÓTÓW

- CU – łac. colitis ulcerosa – wrzodziejące zapalenie jelita grubego
- UC – ang. ulcerative colitis – wrzodziejące zapalenie jelita grubego
- CD – ang. Crohn's disease – choroba Leśniowskiego-Crohna
- IC – ang. indeterminate colitis – nieokreślone zapalenie okrężnicy
- IBD – ang. Inflammatory Bowel Diseases – nieswoiste zapalenia jelit
- NOD2 – ang. nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
- CARD15 – ang. caspase recruitment domain family, member 15 – inna nazwa białka NOD2
- ASCA – ang. – anti saccharomyces cerevisiae antibody – przeciwciała przeciwko Sacharomyces cerevisiae
- TNF-  $\alpha$  – ang. tumor necrosis factor – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$
- DAI Score – ang. Disease Activity Index – współczynnik aktywności choroby
- ECCO – ang. European Crohn's and Colitis Organisation – Europejska Organizacja Choroby Crohna oraz Wrzodziejącego Zapalenia Jelita Grubego
- 5-ASA – ang. 5 aminosalicylic acid – kwas 5-aminosalicylowy
- HPGD – ang. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase – dehydrogenaza hydroksyprostaglandynowa (wcześniej określana jako PGDH)
- SLC22A4 – ang. solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 – gen kodujący transporter karnityny i kationów organicznych 4
- SLC22A5 – ang. solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 – gen kodujący transporter karnityny i kationów organicznych 5
- HRM – ang. high resolution melting – denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością
- PCR – ang. Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PCR-SSCP – ang. single strand conformation polymorphism – polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA
- PCR-HD – ang. Polymerase Chain Reaction – Heteroduplex – analiza heterodupleksów

Badania w części finansowano z projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa  
Wyższego; projekt nr 2PO5E02630

## I. WSTĘP

### 1. Nieswoiste zapalenia jelit

Nieswoiste zapalenia jelit (ang. *Inflammatory Bowel Disease* - IBD) stanowią grupę przewlekłych, nieuleczalnych schorzeń przewodu pokarmowego, cechujących się samoistnymi remisjami i nawrotami, których etiologia pozostaje niewyjaśniona.

Do chorób określanych tym mianem zalicza się wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang. *ulcerative colitis* – UC), chorobę Leśniowskiego-Crohna (ang. *Crohn's disease* – CD) oraz nieokreślone zapalenie okrężnicy (ang. *indeterminate colitis* – IC) – nie przez wszystkich uznawane jako oddzielna jednostka chorobowa o odmiennej patogenezie[1]. Przez niektórych IC traktowane jest jedynie jako rozpoznanie tymczasowe, które zmienia się po zastosowaniu dodatkowym metod diagnostycznych, przez innych z kolei jako stan „zejściowy” po wszystkich rodzajach zapaleń jelit, włącznie z zakażeniami bakteryjnymi.

Wspólną cechą nieswoistych zapaleń jelit jest nieznaną pierwotną przyczyną wywołującą oraz wieloczynnikowa patogeneza.

#### 1.1. Etiologia i patogeneza nieswoistych zapaleń jelit

Przyjmuje się, że w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit uczestniczą czynniki genetyczne, środowiskowe i immunologiczne[2].

##### 1.1.1. Czynniki genetyczny

W 5-10% przypadków chorych na nieswoiste zapalenia jelit obserwowane jest rodzinne ich występowanie[3]. Geny podatności na te choroby położone są na chromosomach 1, 5, 6, 12, 14, 16 i 19. W badaniach GWAS zaobserwowano szczególnie silną asocjację regionu 5q31 oraz locus oznaczonego symbolem IBD2 położonego na chromosomie 12 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego[4]. Z kolei z chorobą Leśniowskiego-Crohna związany jest gen *NOD2/CARD15* położony na chromosomie 16 (locus IBD1)[5, 6]. Gen *NOD2* odgrywa szczególną rolę w odpowiedzi ustroju na działanie antygenów bakteryjnych, a dużą ekspresję tego genu wykazano w komórkach Panetha, najliczniejszych w jelicie cienkim, w którym pełnią funkcję obronną przed bakteriami jelitowymi. Mechanizm tej obrony polega m.in. na wytwarzaniu czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i defensyn. Stwierdzono, że obecność dwóch alleli zmutowanego genu zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę Crohna nawet 40-krotnie[7].

### 1.1.2. Czynniki środowiskowe

Potwierdzono, że flora bakteryjna jelita chorych na nieswoiste choroby jelit różni się ilościowo i jakościowo od bakterii występujących u ludzi zdrowych, ale dotychczas nie udowodniono, czy jest to przyczyna czy raczej skutek choroby. Szczególną rolę mogą odrywać niektóre szczepy *Escherichia coli* i *Bacteroides vulgatus*[8]. Bada się również rolę, jaką może mieć *Listeria monocytogenes*. Według innych doniesień wykazano, że u myszy probioza przy pomocy *Lactobacillus reuteri*, poprzez zmniejszenie przylegania bakterii do błony śluzowej i ich translokacji, zapobiega zapaleniu[9].

### 1.1.3. Czynniki immunologiczne

Według koncepcji immunologicznego podłoża choroby kaskadę procesu zapalnego rozpoczyna ekspozycja antygenów w świetle jelita. Ten nieznaną antygen może być związek (alergenem) zawartym w pożywieniu lub czynnikiem infekcyjnym – bakteryjnym lub wirusowym.

Udowodniono, że w tkankach zmienionych w przebiegu zarówno wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, jak i choroby Leśniowskiego-Crohna zachodzi wzmożona aktywacja limfocytów T-pomocniczych o fenotypie CD4+, które z kolei wytwarzają zwiększone ilości cytokin[10]. W CU dominuje subpopulacja komórek Th2 produkujących interleukiny (przeciwzapalne) IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, które z kolei odpowiedzialne są za humoralny typ odpowiedzi ze zwiększoną syntezą przeciwciał[11]. Jednym z rodzajów takich przeciwciał są autoprzeciwciała przeciwko okołojądrowemu antygenowi granulocytów (pANCA), obecne w 30-80% przypadków chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego[12, 13]. W chorobie Leśniowskiego-Crohna przeważają komórki Th1 i odpowiedź typu komórkowego uwarunkowana cytokinami prozapalnymi, takimi jak IL-2, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$ . W CD dochodzi też do zahamowania apoptozy limfocytów T, co oznacza utratę kontroli tych komórek nad odpowiedzią immunologiczną i stałe podtrzymywanie zapalenia w ścianie jelita. Przeciwciałami charakterystycznymi dla choroby Leśniowskiego-Crohna są przeciwciała przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)[14, 15].

Różnice w zaburzeniach immunologicznych charakteryzujących CU i CD odpowiadają za inny przebieg procesu zapalnego w obu chorobach. W obu jednostkach stwierdzono jednak zwiększone stężenie IL-23 i IL-17 w błonie śluzowej jelita[16, 17].

W IBD nie ma osłabienia odpowiedzi immunologicznej, natomiast istnieje nadmierna i przedłużona aktywacja lokalnej odpowiedzi odpornościowej na terenie jelita, stąd głównym celem terapii jest jej supresja i przywrócenie równowagi układu immunologicznego.

## 2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

### 2.1. Definicja

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (łac. *colitis ulcerosa* – CU) jest rozlanym, nieswoistym procesem zapalnym błony śluzowej odbytnicy lub odbytnicy i okrężnicy, prowadzącym w części przypadków do powstania owrzodzeń[18].

### 2.2. Rys historyczny

Opis pierwszych przypadków wrzodziejących zmian w jelicie grubym u ludzi zmarłych z powodu krwistej biegunki datuje się na 1859 r. Wtedy to Samuel Wilks, brytyjski lekarz i historyk medycyny z Guy's Hospital w Londynie, wprowadził termin wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – *colitis ulcerosa*.

Dopiero 73 lata później, w 1932r. Burrill Crohn wyodrębnił z tego zespołu odcinkowe, ziarniniakowate zapalenie jelit i opisał jako nową jednostkę chorobową – *regional ileitis*.

### 2.3. Epidemiologia

W Europie Zachodniej i w Ameryce Północnej zapadalność na wrzodziejące zapalenie jelita grubego wynosi według różnych źródeł od 10 do 20 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców na rok[19]. Zapadalność na CU jest stabilna w ciągu ostatnich 10-leci, w odróżnieniu od choroby Crohna, która wykazuje znamienne wzrost zapadalności w ostatnich dekadach. W krajach zachodnich 1 na 500 mieszkańców cierpi na IBD, a wg danych z Wielkiej Brytanii nawet 1 na 250 osób; w tym wrzodziejące zapalenie jelita grubego występuje 2 razy częściej niż choroba Leśniowskiego-Crohna[19-22]. W Polsce brak jest danych epidemiologicznych, dotyczących występowania i zapadalności na CU. Choroba jest znacznie częstsza u rasy białej. Na CU zapadają ludzie młodzi, bez wyraźnej przewagi którejkolwiek z płci. Szczyt zachorowań przypada na ludzi w wieku 20-40 lat. Zwrócono uwagę na zjawisko późniejszego ujawniania się wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u mężczyzn, nie ma jednak zadowalającego wytłumaczenia tego faktu. Obserwuje się niższy odsetek zachorowalności na wrzodziejące zapalenie jelita grubego u osób palących papierosy[23-25]. Appendektomia z kolei wydaje się chronić przed zachorowaniem, zwłaszcza gdy zostanie wykonana przed 21 rokiem życia[26-30].

## 2.4. Klasyfikacja montrealaska wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Na Światowym Kongresie Gastroenterologii w Montrealu w 2005r. zaproponowano klasyfikację wrzodziejącego zapalenia jelita grubego opartą na dwóch kryteriach[31-34]:

- rozległości zmian w jelicie grubym (Tab.1)

Tab.1. Montrealska klasyfikacja wrzodziejącego zapalenia jelita grubego w zależności od rozległości zmian w jelicie

SYMBOL	NAZWA	OPIS ZMIAN
E1	<i>proctitis ulcerosa</i>	zmiany ograniczone do odbytnicy nie przekraczające zagięcia esiczo-prostniczego
E2	lewostronne CU (dystalne CU)	zmiany położone dystalnie do zagięcia śledzionowego
E3	rozległe CU (również <i>pancolitis</i> )	zmiany położone proksymalnie do zagięcia śledzionowego

- ciężkości rzutu choroby (Tab. 2)

Tab.2. Montrealska klasyfikacja wrzodziejącego zapalenia jelita grubego w zależności od ciężkości rzutu choroby

SYMBOL	NAZWA	OPIS OBJAWÓW
S0	remisja kliniczna	postać bezobjawowa
S1	łagodny rzut CU	do 4 stolców na dobę (z lub bez krwi); bez objawów ogólnych; prawidłowe OB
S2	umiarkowany rzut CU	ponad 4 stolce na dobę; miernie nasilone objawy ogólne
S3	ciężki rzut CU	ponad 6 krwistych stolców na dobę; tętno>90/min; ciepłota ciała≥37.5°C; Hb<10.5g%; OB≥30mm/godz



## 2.5. Objawy i przebieg kliniczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Choroba pojawia się nagle. Dominującym, a zarazem zwykle pierwszym objawem jest biegunka, często krwista. W aktywnym zapaleniu całej okrężnicy stolec może być oddawany nawet 20 razy na dobę. Z kolei w przypadku chorych ze zmianami ograniczonymi do odbytnicy (*proctitis ulcerosa*) liczba wypróżnień może być prawidłowa, a jedynym objawem jest wtedy krwawienie z odbytu. Ponadto często obserwowane są: bóle brzucha (zwykle w dolnym lewym kwadrancie brzucha lub w odbytnicy), gorączka, osłabienie i spadek masy ciała[35, 36].

W około 50 % przypadków choroba obejmuje wyłącznie odcinek dystalny jelita grubego (stadium E1 wg klasyfikacji montrealskiej), w ok. 30 % choroba dotyczy lewej połowy okrężnicy (stadium E2), a w około 20 % obejmuje całe jelito grube (E3). Podobny rozkład procentowy dotyczy ciężkości rzutu choroby (50% S1 wg klasyfikacji montrealskiej, 30% S2 i 20% S3).

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego przebiega najczęściej w postaci ostrych rzutów podzielonych okresami pełnej remisji. U niektórych pacjentów choroba jest stale aktywna, z kolei długie okresy remisji dotyczą osób w starszym wieku.

Za prawdopodobne przyczyny nawrotów uważa się stresy psychiczne, zmiany w sposobie odżywiania, zażywanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych lub antybiotyków, zakażenia pokarmowe, ale także zaprzestanie palenia papierosów. Główną przyczyną nawrotu jest jednak zaniechanie przyjmowania leków podtrzymujących remisję.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego objawia się zarówno w postaci powikłań jelitowych, jak i pozajelitowych[37].

### 2.5.1. Objawy i powikłania jelitowe w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Początkowe jelitowe objawy CU obserwowane są w badaniu endoskopowym. Łagodna postać choroby charakteryzuje się powierzchownymi nadżerkami, zatarciem rysunku naczyniowego błony śluzowej, jej granulowaniem, kruchością i wysiękiem zapalnym[38]. W ciężkiej postaci mogą dominować głębokie owrzodzenia i obszary obnażonej błony śluzowej, pozbawionej nabłonka (Ryc.1).

Postać przewlekła choroby charakteryzuje się wygładzeniem fałdów błony śluzowej i rozwojem pseudopolipów zapalnych. Pseudopolipowość stwierdzana jest nawet u 15% chorych na CU i może powstać nawet w czasie pierwszego rzutu choroby[39-41].

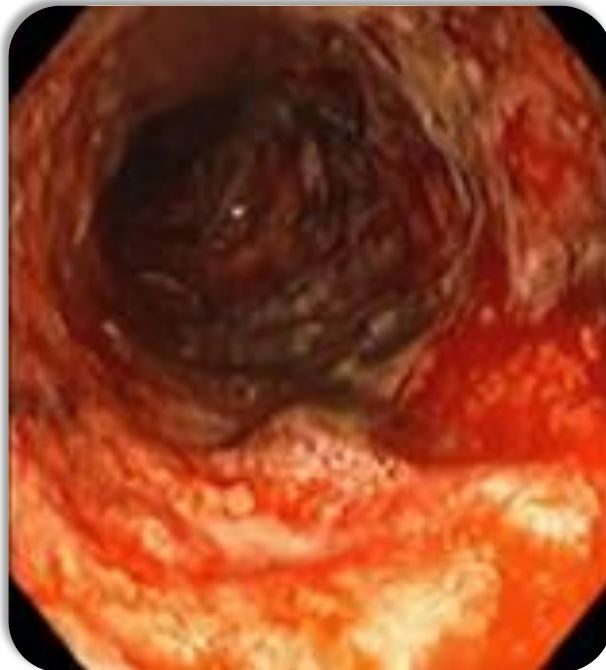
Groźnym powikłaniem jest ostra toksyczna rozstrzeń okrężnicy (*megacolon toxicum*). Stan ten rozwija się szczególnie u chorych, u których proces chorobowy obejmuje całe jelito (*pancolitis*) i polega na porażeniu

ściany jelita przez toksyny bakteryjne oraz przenikaniu drobnoustrojów, głównie bakterii beztlenowych, przez ścianę jelita do jamy otrzewnej[42-45].

Innym ciężkim powikłaniem jest perforacja jelita z zapaleniem otrzewnej, która może wikać *megacolon toxicum* lub występować niezależnie w ciężkiej postaci CU.

Z kolei najpoważniejszym odległym powikłaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest rak tego narządu. Czynnikiem ryzyka wystąpienia raka jest długi (>8 lat) czas trwania choroby, wystąpienie ognisk dysplazji, początek choroby w dzieciństwie oraz rozległe zajęcie jelita grubego[46, 47].

Ryc.1. Obraz endoskopowy ciężkiego rzutu CU (materiał własny Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej)



### 2.5.2. Objawy pozajelitowe w przebiegu wrzodziejącego zapalenie jelita grubego

Choroby towarzyszące, zwane też powikłaniami układowymi czy manifestacjami pozajelitowymi wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, dzieli się na dwie grupy:

- choroby, które pojawiają się głównie w okresach zaostrzeń CU: zapalenia dużych stawów, zapalenie tęczówki, rumień guzowaty, ropne zgorzelinowe zapalenie skóry[48, 49];
- choroby przebiegające niezależnie od zapalenia jelita grubego: zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (Ryc.2), powikłania ze strony wątroby i dróg żółciowych z stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych włącznie, co może stanowić wskazanie do przeszczepu wątroby[50-52].

Ryc.2. Pacjent z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (materiał własny Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej)



### 2.5.3. Badania dodatkowe, diagnostyka

Do panelu standartowych badań laboratoryjnych u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zalicza się – poza rutynowym badaniem morfologii krwi obwodowej, OB, CRP, stężeń elektrolitów i frakcji białkowych – okresowe oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej, GGTP i stężenia bilirubiny w surowicy krwi.

Ze względu na krwistą biegunkę obowiązuje badanie bakteriologiczne i parazytologiczne kału.

Badanie endoskopowe z pobraniem wycinków do badania histopatologicznego jest z kolei "złotym standardem" w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Pobranie licznych wycinków ze wszystkich zmienionych części jelita grubego (nawet ponad 30) służy również w poszukiwaniu ognisk dysplazji[53, 54].

Z kolei do klasycznych badań diagnostycznych wykonywanych u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego należy zdjęcie przeglądowe jamy brzusznej, które pozwala wykryć ostrą toksyczną rozstrzeń okrężnicy i ewentualną obecność powietrza w wolnej jamie otrzewnej, oraz doodbytniczy wlew cieniujący. Wlew kontrastowy, przy dłuższej trwającej chorobie, może ujawniać skrócenie jelita, owrzodzenia, pseudopolipy, a także charakterystyczny obraz zaniku haustracji zwanym w radiologii objawem „sztywnej rury”.

Ocenę aktualnego stanu pacjenta i zakwalifikowanie go do odpowiedniej grupy chorych z łagodnym, umiarkowanym lub ciężkim przebiegiem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, na podstawie wywiadu, jak i badań dodatkowych, umożliwia tzw. Mayo DAI (Disease Activity Index) Score. Maksymalna wartość tego indeksu wynosi 12 (Tab.3)[55, 56].

Tabela. 3. Indeks aktywności choroby (DAI Score)

Ilość wypróżnień w porównaniu do stanu normalnego	Krwawienie (ilość krwi w stolcu)	PGA (Physician's Global Assessment)	Ocena endoskopowa
0 = normalna	0 = brak	0 = bez cech chorobowych	0 = norma, obraz prawidłowy
1 = 1-2 więcej niż normalnie	1 = niewielkie (pasemka krwi poniżej połowy przypadków)	1 = łagodny przebieg choroby	1 = łagodny przebieg (przekrwienie, kruchość śluzówki, zatarty rysunek naczyniowy)
2 = 3-4 więcej niż normalnie	2 = umiarkowane (wyraźna, w większości przypadków)	2 = umiarkowany przebieg choroby	2 = umiarkowany przebieg (nasilone przekrwienie śluzówki, nadżerki, brak rysunku naczyniowego)
3 = 5 lub więcej niż normalnie	3 = poważne (czysta krew)	3 = ciężki przebieg choroby	3 = ciężki przebieg (samoistne krwawienia, owrzodzenia)

Mayo DAI: 4-6 – łagodna postać choroby

7-9 – umiarkowana (średniociężka) postać choroby

10-12 – ciężka postać choroby

## 2.6. Leczenie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Obecnie obowiązujące standardy leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, zarówno leczenia zachowawczego, jak i operacyjnego, a także postępowania w czasie trwania remisji zostały zawarte w tzw. II Konsensusie ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) z 2012r.[57, 58].

Poza leczeniem farmakologicznym lub operacyjnym ważna jest odpowiednia dieta, szczególnie w trakcie ostrego rzutu choroby – ubogoresztkowa, z odpowiednią ilością kalorii i białka, bezmleczna.

### 2.6.1. Leczenie farmakologiczne

Sposób leczenia zachowawczego ostrych rzutów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego zależy od ciężkości ich przebiegu (łagodny, umiarkowany i ciężki rzut wg klasyfikacji montrealskiej) oraz rozległości zmian w jelicie grubym (*proctitis*, lewostronny *colitis*, *pancolitis*).

#### 2.6.1.1. Preparaty kwasu 5-ASA

Mechanizm działania preparatów kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) pozostaje wciąż nieznanym. Prawdopodobnie hamują one aktywację lokalnej lipooksygenazy, wymiatają aktywne formy tlenu i modulują produkcję cytokin[59-61]. Do tej grupy leków zalicza się monomer 5-ASA (mesalazynę) i dimer 5-ASA (olsalazynę). Nieco odmiennym lekiem jest sulfasalazyna, uważana nadal przez wiele ośrodków za lek I rzutu, która jest zbudowana z sulfapirydyny i 5-ASA połączonych wiązaniem dwuazowym[62].

Preparaty 5-ASA w monoterapii zarezerwowane są dla łagodnej postaci choroby. Sulfasalazynę lub mesalazynę podaje się w dawce leczniczej 3-4g/dobę w różnej postaci leku (tabletki, czopki, wlewki doodbytnicze), w zależności od umiejscowienia zmian chorobowych. W okresie remisji wskazane jest podawanie mesalazyny lub sulfasalazyny w dawce 2g/dobę, szczególnie że udowodnione zostało chemioprewencyjne działanie tych dawek, polegające na zmniejszeniu ryzyka nowotworowego w jelicie grubym[63-66].

#### 2.6.1.2. Kortykosteroidy

Preparaty kortykosteroidów blokują wczesną i późną fazę procesu zapalnego. Glukokortykosteroidy włączane są najczęściej w umiarkowanym i ciężkim rzucie choroby[67, 68]. Najczęstsza dobową doustną dawką prednizonu wynosi 40-60mg (0,75-1 mg/kg m.c.). W przypadku *proctitis ulcerosa* zastosowanie mają sterydy podawane w formie wlewk doodbytniczych, np. hydrokortyzon w dawce 50-100mg na wlewkę.

W ciężkich postaciach zapalenia jelita podaje się sterydy drogą dożylną, hydrokortyzon 300 mg/dobę, metyloprednizolon 60 mg/dobę.

#### 2.6.1.3. Leki immunosupresyjne

Stosowanie analogów puryn: azatiopryny (2-2,5 mg/kg m.c./dobę) i 6-merkaptopuryny (1-1,5 mg/kg m.c./dobę) jest szczególnie wskazane w oporności na leczenie kortykosteroidami oraz gdy występują objawy uboczne steroidoterapii, a także steroidozależność[69]. Leki te nie są skuteczne w leczeniu ostrego rzutu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, ponieważ ich działanie rozpoczyna się dopiero po 3-4 miesiącach od początku terapii (w ciężkim rzucie skuteczna może być jedynie podawana dożylnie cyklosporyna)[70].

#### 2.6.1.4. Leczenie biologiczne

Nowym lekiem dotychczas zarezerwowanym dla choroby Leśniowskiego-Crohna jest infliksymab w dawce 4-5mg/kg masy ciała. Preparat ten jest chimerycznym przeciwciałem przeciwko czynnikowi martwicy nowotworów  $\alpha$ . Uważa się, że wskazaniem do jego zastosowania jest aktywne wrzodziejące zapalenie jelita grubego nieodpowiadające na leczenie glukokortykosteroidami i lekami immunosupresyjnymi[71-73].

#### 2.6.1.5. Antybiotyki

W ciężkim rzucie CU podaje się dożylnie antybiotyki o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego[74]. Najczęściej jest to ciprofloksacyna (0,4-0,8 g/dobę) i metronidazol działający na florę beztlenową (1,5g/dobę).

#### 2.6.1.6. Probiotyki

Zastosowanie, szczególnie w utrzymaniu remisji, znalazły szczególnie niepatogenne szczepy *Escherichia coli*, z kolei mieszanina wielu bakterii probiotycznych (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*) skutecznie zapobiega zapaleniom zbiornika jelitowego po proktokolektomii odtwórczej [75].

#### 2.6.1.7. Inne

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, szczególnie kwasu masłowego, będącego substratem energetycznym dla nabłonka jelita grubego. Powstaje on w czasie bakteryjnej fermentacji węglowodanów w jelicie. Wykazuje przy tym działanie troficzne na

komórki krypt jelita grubego, zwiększa wchłanianie wody i sodu, wydzielanie wodorowęglanów oraz przepływ krwi przez błonę śluzową i wydzielanie śluzu. Stwierdzono ponadto, że maślany indukują apoptozę nowotworowych linii komórkowych nabłonka jelita grubego, działają więc zapobiegawczo[76].

## 2.6.2. Leczenie operacyjne

### 2.6.2.1. Wskazania do leczenia operacyjnego

U ok. 80% chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego o łagodnym przebiegu leczenie zachowawcze przynosi efekt, jakkolwiek uważa się, że ponad 10-letni wywiad trwania choroby lub ogniska dysplazji znacznego stopnia, pomimo początkowego dobrego efektu leczenia zachowawczego, są wskazaniem do operacji[77]. U pozostałych 20% istnieją wskazania do wcześniejszego leczenia operacyjnego, które w zależności od stanu klinicznego pacjenta podzielono na trzy grupy (Tab.4).

Tab. 4. Wskazania do operacyjnego leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

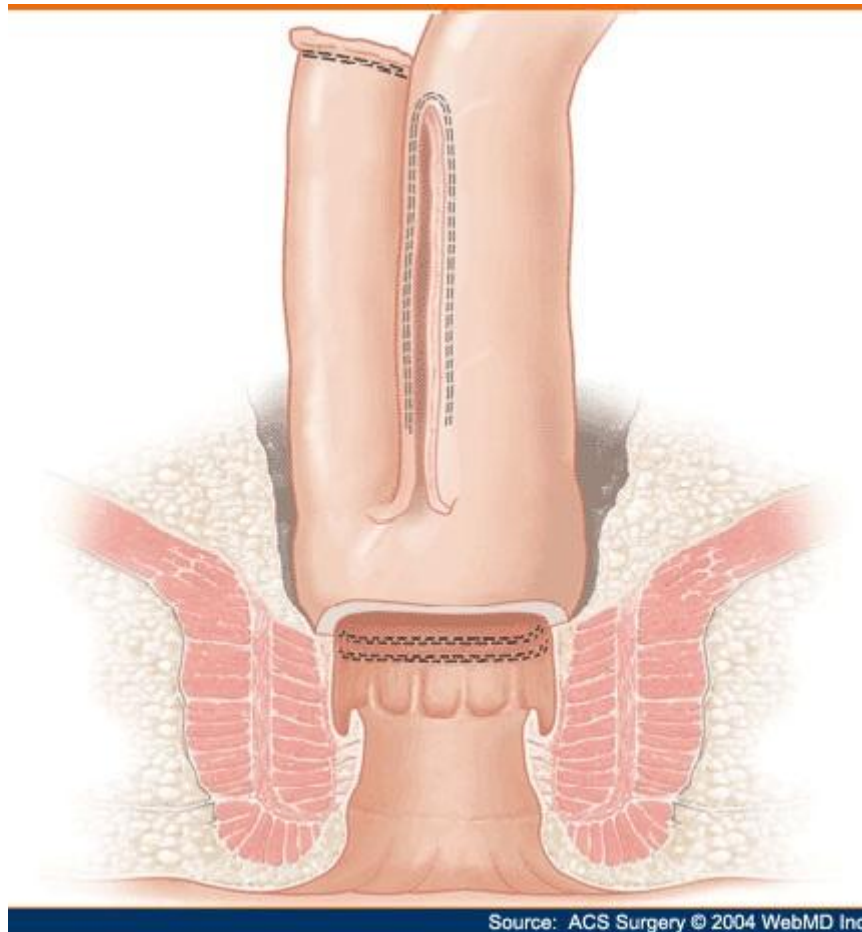
POSTĘPOWANIE OPERACYJNE	WSKAZANIA
Wybiórcze (operacje planowe)	choroba wyniszczająca, niereagująca na leczenie zachowawcze; współistniejące powikłania ze strony innych narządów; podejrzenie przemiany nowotworowej; zwężenie światła jelita i niektóre inne powikłania miejscowe, jak przetoka odbytniczo-pochwowa; zahamowanie wzrostu z opóźnieniem dojrzewania płciowego u dzieci
Pilne (operacje w ciągu 48 godzin)	ostry rzut choroby; brak poprawy po intensywnym leczeniu zachowawczym
Nagłe	gwałtowne pogorszenie się stanu chorego; wstrząs septyczny; perforacja jelita; zapalenie otrzewnej; masywny krwotok



### 2.6.2.2. Techniki operacyjne

Celem leczenia chirurgicznego jest usunięcie całego jelita grubego. Jeżeli operacja jest planowa ze wskazań wybiórczych oraz możliwe jest zachowanie aparatu zwieraczowego, wykonuje się proktokolektomię odtwórczą z wytworzeniem zbiornika jelitowego z jelita cienkiego i zespoleniem zbiornikowo-jelitowym (Ryc.3). W leczeniu dwuetapowym tego typu zespolenie odbarcza się na okres kilku miesięcy przetoką jelitową na jelicie krętym[78].

Ryc.3. Schemat zbiornika jelitowego wytworzonego metodą staplerową z dystalnego odcinka jelita krętego oraz zespolenia zbiornikowo-jelitowego (ASC Surgery – [www.ascsurgery.com](http://www.ascsurgery.com))



Z kolei przy nagłych wskazaniach do leczenia operacyjnego, u chorego w ciężkim stanie ogólnym, wdraża się najczęściej leczenie operacyjne trzyetapowe – w I etapie wykonuje się kolektomię z pozostawieniem odbytnicy, a rekonstrukcję ciągłości przewodu pokarmowego z wytworzeniem zbiornika jelitowego wykonuje się w dalszych etapach po ustąpieniu bezpośredniego zagrożenia życia pacjenta i po wyrównaniu wszystkich niedoborów (Ryc.4)[79-81].

Ryc.4. Obraz błony śluzowej jelita grubego w ciężkim rzucie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – preparat pooperacyjny (materiał własny Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej)



### 2.6.2.3. Powikłania leczenia operacyjnego

Powikłania po leczeniu operacyjnym pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego dzielimy na wczesne i późne (odległe). Wczesne powikłania są związane bezpośrednio z przeprowadzonym zabiegiem operacyjnym. Należą do nich niedrożność pooperacyjna, krwawienie z zespolenia jelitowego oraz rozejście się zespolenia jelitowego. W znacznym stopniu czasowa ileostomia protekcyjna zabezpiecza przed występowaniem tych powikłań.

Do odległych powikłań leczenia operacyjnego, występujących od 30 do 40% chorych, zalicza się: zwężenie w miejscu zespolenia zbiornikowo-jelitowego, zapalenie zbiornika jelitowego oraz zapalenie mankietu odbytnicy (*cuffitis*). Do odległych powikłań zaliczyć również można zaburzenia funkcji seksualnych oraz kontroli defekacji z nietrzymaniem stolca włącznie[82-85].

Zwężenie w miejscu zespolenia zbiornika jelitowego z odbytem lub mankietem odbytnicy pojawia się u 9% operowanych pacjentów, ale w większości poddaje się zabiegom rozszerzania przez odbyt.

Zapalenie zbiornika jelitowego (*pouchitis*), po 10 latach od zabiegu operacyjnego, występuje nawet u 50% chorych[86]. W zależności od czasu trwania dolegliwości (wartość graniczna to 4 tygodnie) rozróżniamy ostre lub przewlekłe zapalenie zbiornika. Do postawienia właściwego rozpoznania oraz do określenia aktywności zapalenia oszacowano wskaźnik aktywności zapalenia zbiornika jelitowego (*Pouchitis Disease Activity Index (PDAI)*). Wskaźnik ten jest wyliczany na podstawie objawów, badania endoskopowego i badania histopatologicznego (maksymalnie po 6 punktów w każdej grupie). Wskaźnik powyżej 7 świadczy o aktywnym zapaleniu[87, 88].

Czynnikami ryzyka wystąpienia zapalenia zbiornika jelitowego w przebiegu pooperacyjnym są: rozległe zmiany zapalne jelita (*pancolitis*), wsteczne zapalenie jelita krętego (*backwash ileitis*), powikłania pozajelitowe – zwłaszcza PSC, obecność przeciwciał pANCA, zażywanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych[89-91]. Zapalenie zbiornika częściej występuje u osób niepalących[92].

Leczenie zapalenia zbiornika jelitowego jest trudne i nie zawsze skuteczne. U 5-7% chorych zachodzi konieczność przeprowadzenia powtórnej operacji z usunięciem zbiornika i wytworzeniem końcowej ileostomii[93]. Leczenie zachowawcze ostrego zapalenia zbiornika opiera się na antybiotykach: Ciprofloxacynie i Metronidazolu oraz Mesalazynie w czopkach lub wlewkach[94, 95]. Przy przewlekłym zapaleniu zaleca się włączyć dodatkowo Budesonid we wlewkach[96]. W obu przypadkach zwraca się uwagę na rolę probiotyków, szczególnie w prewencji nawrotów zapalenia[97, 98].

Zapalenie mankietu odbytnicy (*cuffitis*) naśladuje zapalenie zbiornika, ale częściej powoduje krwawienia. Leczenie głównie opiera się na Mesalazynie podawanej w czopkach[99].

## 2.7. Genetyczne podłoże wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

### 2.7.1. Gen *NOD2*

Gen *NOD2* (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*) koduje receptor dla peptydoglikanów bakterii i jest zaangażowany w kontrolę transkrypcji cytokin prozapalnych i defensyn. Białko *NOD2*, ulegające ekspresji w monocytach krwi obwodowej, makrofagach i jelitowych komórkach Panetha, uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej na infekcje bakteryjną[100]. Trzy warianty c.2104C>T (p.Arg702Trp), c.2722G>C (p.Gly908Arg), c.3019\_3020insC (p.Leu1007Profs1X) zlokalizowane w domenie LRR genu *NOD2* odpowiedzialnej za interakcje z lipopolisacharydami i peptydoglikanami bakteryjnymi związane są z 15-20% przypadków występowania rodzinnych przypadków choroby. Badania prowadzone w Europie wykazały, że te trzy warianty polimorficzne związane są z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna, natomiast nie warunkują wrzodziejącego zapalenia jelita grubego[101]. Nosiciele jednego z powyższych wariantów genu *NOD2* są obciążeni 4-krotnie wyższym ryzykiem wystąpienia choroby Crohna, zaś wśród nosicieli tych wariantów w układzie homozygotycznym ryzyko wystąpienia choroby wzrasta 15 do 40-krotnie[102]. Wielu autorów donosi o związku zmian w genie *NOD2/CARD15* z fenotypem. Wykazano korelację wariantów sekwencji w genie *NOD2/CARD15* zarówno z lokalizacją krętniczą zapalenia, jak i wcześniejszym wiekiem wystąpienia objawów. Ponadto u nosicieli zmutowanych alleli, gdzie pierwsze operacje były w większości skutkiem zwężeniem światła jelita, obserwowano zwiększoną częstość nawrotów pooperacyjnych choroby i konieczność wykonania kolejnego zabiegu chirurgicznego[103-106].

### 2.7.2. Gen *HPGD* – charakterystyka i funkcja

Gen *HPGD* (ang. *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*)(EC 1.1.1.141), zlokalizowany na chromosomie 4q34-q35, jest głównym enzymem zaangażowanym w degradację prostaglandyny[107, 108]. Sekwencje nukleotydów tego genu ustalono w 1990 roku[107]. Białko składa się z 266 aminokwasów[109]. Gen składa się z 7 eksonów, natomiast transkrypt składa się z 2561 nukleotydów. Region 4q34-35 jest w literaturze postrzegany jako potencjalne locus warunkujące wystąpienie choroby [110]. Jedną z funkcji genu *HPGD* jest inhibicja cyklooksygenazy 2[111-113]. Funkcja ta jest tożsama z działaniem leków przeciwzapalnych stosowanych w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit. Białko ma aktywność dehydrogenazy i przekształca prostaglandynę w jej keto-pochodne, co jest pierwszym etapem jej dezaktywacji[114, 115].

Prostaglandyny są złożone z dwudziestu atomów węgla z pięciowęglowym pierścieniami i są syntetyzowane z kwasu arachidowego przez fosfolipazę A2 i szlak cyklooksygenazy. Pełnią one szereg funkcji w

komórkach, a jedną z nich jest mediowanie procesu zapalnego. Ich wysokie stężenie jest wynikiem wysokiego poziomu ekspresji cyklooksygenazy 2 w trakcie zapalenia[116]. Podawanie aspiryny prowadzi do powstania aspirynopochodnych lipoksyn, a cyklooksygenaza 2 jest acetylowana przez aspirynę i 5-lipooksygenazę [116]. Różnica między aktywnością leków przeciwzapalnych a aktywnością *HPGD* polega na tym, że leki przeciwzapalne działają na cyklooksygenazę, a 15-PGHD na hormon przez nią wytwarzany[117]. W związku z wiedzą, iż gen *HPGD* odgrywa dużą rolę w regulacji procesu zapalnego, oczekiwać można, że badania tego genu wniosą nowe informacje na temat biologii molekularnej nieswoistych zapaleń jelit.

### 2.7.3. Warianty polimorfizmów genów *SLC22A4* i *SLC22A5*

W badaniach asocjacyjnych określono związek regionu 5q31 z podwyższonym ryzykiem występowania chorób zapalnych jelit[118-120]. Stosując analizę sprzężeń, określono haplotyp tego regionu związany z podatnością na występowanie choroby[121]. Ryzyko wystąpienia choroby jest w przypadku heterozygot dwukrotnie wyższe, a homozygot 6-krotnie wyższe[4]. Można podejrzewać, że w tym regionie znajduje się kolejny gen warunkujący podatność na chorobę. W regionie związanym z haplotypem ryzyka obejmującym 250 kbp znajdują się dwa geny kodujące organiczne transportery karnityny oraz kationów organicznych, *SLC22A4* i *SLC22A5*[122, 123]. W pierwszym z nich występuje substytucja T na C w pozycji 1507, która powoduje zamianę fenyloalaniny na leucynę w kodonie 503. W drugim genie, jakim jest *SLC22A5*, występuje transwersja G na C w regionie promotorowym. Te dwa polimorfizmy związane są z redukcją transportu karnityny, zwiększeniem aktywności transporterów kationów organicznych oraz upośledzają działanie białek szoku cieplnego[124]. Stosując analizę sprzężeń, określono haplotyp tego regionu, *STC22-T/C*, związany z podatnością na występowanie chorób zapalnych jelit. Zaobserwowano również wyższą częstość haplotypu *STC22-T/C* u pacjentów z zapaleniem obejmującym okrężnicę, a w układzie homozygotycznym znacznie niższy wiek wystąpienia choroby[118].

## II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Celem przedstawionej pracy była:

1. Kliniczna i genetyczna charakterystyka grupy chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej.

Cel ten realizowano poprzez:

a) zgromadzenie danych dotyczących przebiegu choroby u chorych leczonych w klinice;

b) określenie częstości występowania wariantów polimorficznych genu *NOD2*;

c) określenie częstości występowania wariantów polimorficznych genów *SLC22A4* i *SLC22A5*

d) charakterystykę molekularną genu *HPGD* pod względem występowania mutacji i polimorfizmów w badanej grupie

2. Ocena udziału wariantów genów *NOD2*, *SLC22A4*, *SLC22A5* i *HPGD* w warunkowaniu występowania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego o ciężkim przebiegu.

### III. MATERIAŁ I METODY

#### 1. Grupa badana

Badaniami objęto 100 pacjentów leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej UM w Poznaniu w latach 2007-2011 z powodu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. U wszystkich pacjentów objętych badaniem wdrożono leczenie chirurgiczne.

Pierwszą grupą pacjentów kierowanych do leczenia w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej są chorzy z wybiórczymi wskazaniami do leczenia operacyjnego, najczęściej kierowani po długotrwałym leczeniu przez lekarzy gastroenterologów. Większość z nich po wieloletnim przebiegu choroby nie reaguje już na leczenie zachowawcze, część ma powikłania pozajelitowe lub istotne podejrzenie przemiany nowotworowej.

Drugą grupę pacjentów stanowią chorzy kierowani w trybie ostrym z innych oddziałów chirurgicznych bądź internistycznych, a także przyjmowani bezpośrednio do Kliniki w ramach ostrego dyżuru.

Chorzy z ustalonym rozpoznaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego byli kwalifikowani do badań genetycznych na podstawie badania lekarskiego i dostępnej dokumentacji medycznej po uprzednim wyrażeniu pisemnej zgody. Z każdym pacjentem zebrany był szczegółowy wywiad dotyczący początku choroby, jej przebiegu, wykonanej diagnostyki, powikłań pozajelitowych, występowania nieswoistych zapaleń jelit lub innych chorób autoimmunologicznych w rodzinie.

U części pacjentów, szczególnie tych, którzy nie trafili na oddział w trybie planowym, wykonano dodatkowe badanie endoskopowe jelita grubego. Wszyscy pacjenci zostali ocenieni wg skali montrealskiej oraz dla każdego oszacowano współczynnik DAI.

Badania genetyczne były prowadzone na DNA wyizolowanym z komórek krwi obwodowej włączonych do badania chorych. Krew (ok. 10 ml) pobierana była podczas rutynowych badań laboratoryjnych wykonywanych u pacjentów w czasie przyjmowania do szpitala, w trakcie terapii lub w trakcie przygotowywania pacjenta do zabiegu operacyjnego.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 428/10 z 06 maja 2010r.).

#### 2. Grupa kontrolna

154 osobowa grupa kontrolna 77 niespokrewnionych mężczyzn i 77 niespokrewnionych kobiet wybranych losowo z populacji polskiej.

### 3. Analizy molekularne

#### 3.1 Izolacja DNA z zastosowaniem izotiocyanianu guanidyny (GTC)

Celem procesu izolacji jest uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA, który powinien być pobawiony wszelkich zanieczyszczeń, takich jak białka czy enzymy, ponieważ mogą one być inhibitorami w czasie reakcji wykonywanych w trakcie analiz. DNA po wyizolowaniu był oceniany pod względem ilości zanieczyszczeń oraz stężenia, a następnie zamrażany w  $-20^{\circ}\text{C}$  i w takich warunkach może być przechowywany przez lata.

1. Do 5 ml krwi obwodowej pobranej na 50  $\mu\text{l}$  10% EDTA dodano 25 ml buforu do lizy, inkubowano 30 minut w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$ ;
2. Po zakończeniu inkubacji próby odwirowano w wirówce 15 minut przy 2500 rpm w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , po odwirowaniu odrzucono supernatant;
3. Otrzymany osad zawieszono w 500  $\mu\text{l}$  buforu do lizy, dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$  przez 10 min;
4. Dodano 2 ml GTC, dokładnie wymieszano i poddano inkubacji w temp.  $0^{\circ}\text{C}$  przez 15 min;
5. Dodano 2,5 ml mieszaniny fenol – chloroform – alkohol izoamylowy i dokładnie wymieszano;
6. Całość wirowano przez 15 min - 3000 rpm w  $4^{\circ}\text{C}$ ;
7. Po odwirowaniu zebrano supernatant, a następnie dodano 5 ml etanolu i delikatnie wymieszano, co powoduje wytrącenie DNA;
8. Otrzymany osad przemyto 75% etanolem, następnie wysuszono w temperaturze pokojowej;
9. DNA rozpuszczono w 300  $\mu\text{l}$  sterylnej wody.

#### Odczynniki:

##### Bufor do lizy

wodorowęglan potasu ( $\text{KHCO}_3$ )	10 mM
chlerek amonu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	155 mM
wersenian sodu (EDTA)	0,1 mM
pH=7,4	

##### Roztwór GTC

izotiocyanian guanidyny (GTC)	4 M
cytrynian sodu	31 mM
sarkosyl	0,5%
2- merkptoetanol pH=7,0	0,78%

##### Mieszanina fenol:chloroform: alkohol izoamylowy

fenol	25 jednostek
chloroform	24 jednostek
alkohol izoamylowy pH=8,0	1 jednostka



Chloroform  
Etanol 96%  
Etanol 75%  
Sterylna woda

### 3.2 Ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów DNA

Analiza ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów DNA ma na celu określenie ich czystości oraz stężenia. Do analizy stosowano pomiar absorpcji światła UV z zastosowaniem spektrofotometru. Przed przystąpieniem do pomiaru spektrofotometr odpowiednio skalibrowano. Po kalibracji odczytuje się punktowo wartość absorpcji przy 260, 280 i 320 nm. Pomiary wykonywano na drodze optycznej 1 mm na spektrofotometrze. Stężenie DNA wyliczane jest przez program obsługujący spektrofotometr.

W celu oznaczenia stopnia zanieczyszczenia DNA wyznaczono stosunek absorpcji  $A_{260}/A_{280}$ . W przypadku, gdy stosunek absorpcji  $A_{260}/A_{280}$  mieścił się w granicach 1,8 – 2,0, to DNA jest wystarczająco oczyszczony.

### 3.3 Reakcje PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang. Polymerase chain reaction, PCR*) umożliwia specyficzne powielenie wybranych fragmentów DNA. Synteza komplementarnych nici DNA do sekwencji kodujących genu jest ograniczona położeniem specyficznych starterów. W każdym z kolejnych cykli reakcji liczba kopii fragmentu ograniczonego starterami wzrastała wykładniczo. Otrzymane w ten sposób produkty stanowią substrat do dalszych analizy.

W niniejszej pracy amplifikacji poddawano fragmenty genu *NOD2* obejmujące odpowiednio: c.802C>T (p.P268S), c.2104C>T (p.R702W), c.2722G>C (p.G908R) dla wykonania analizy restrykcyjnej. Badania insercji c.3020insC (*p.Leu1007Profs1X*) wykonano za zastosowaniem analizy PCR-SSCP lub HRM.

W tabeli 5 podano zestawy starterów zastosowane do amplifikacji tych fragmentów oraz temperatury przyłączania starterów.

Tab. 5. Warunki amplifikacji fragmentów genów badanych w ramach rozprawy

Lp.	Gen	Ekson	Warinat	Startery	Wielkość produktu (pz)	t. przyłączania starterów
1	<i>NOD2</i> (OMIM 605956)	4	c.802C>T	802F 5'GGAGGTCTGGGCAGATGTG3' 802R 5'ACTGTCCGCATCGTCA3'	114	56°C
			c.2104C>T	702F 5'GAGCCGCACAACCTTCAGAT3' 702R 5'GCGGGATGGAGTGGAAAGT3'	172	64°C
		8	2722G>C G908R	908F 5'GACTCTTTGGCCTTTTCAGATT3' 908R5'CCAATGGTCTTTTTTCCTTACTCC3'	243	58°C
		11	c.3020insC	F-GGGACAGGTGGGCTTCAGTA R-CCATTCTCTCTCCCG-TCAC	279	55°C
2	<i>HPGD</i> (OMIM 01688)	1	-	PGDH1F 5' CTGGCTTGACAGTTTCCTC PGDH1R 5' AGTGTGTGGGCAGAGAAAT	279	55°C
		2	-	PGDH2F 5' GGAGCCTCTGTGTGTTTAT PGDH2R 5' CCAGTTGACAGATTGATTCC	233	55°C
		3	-	PGDH3F 5' CATGGAATAAAGAATGTATCACT PGDH3R 5' GTTTCCATGACTCCAAGAAC	240	55°C
		4	-	PGDH4F 5' TCTCACTTATGCCTCTGGAT PGDH4R 5' TTTTGTGGTCCAAATTACC	180	55°C
		5	-	PGD51F 5' TCATTTGCATTTTCATTACTGG PGD5R 5' GAGAAAATGAGATATGACGGTTG	194	55°C
		6	-	PGDH6F 5' GCTGAAACCTACAACCTT PGDH6R 5' AATGCTTTGCTTCATCATT	243	55°C
		7	-	PGDH7F 5' TATGCCTCATTCTTTCGTTT PGDH7R 5' TGAAGGAAAACCTCAAACCTGT	299	55°C
3	<i>SLC22A5</i> ( <i>OMIM</i> 603377)	9	c.1507C>T	<i>SLC22A4</i> F CGTCATGGTAGTCTGCTG <i>SLC22A4</i> R TCCTACTACCTTCACTTTC	118	55°C
4	<i>SLC22A4</i> (OMIM 604190)	5'UT R	c.1-207G/C	<i>SIC22A5</i> F GCGCCGCTCGCCTGCCAG <i>SLC22A5</i> R AGGGTAGGGCTCGCGAGCTG	276	55°C

## Procedura

Mieszaninę reakcyjną przygotowano wg tabeli 6 z zastosowaniem starterów do amplifikacji poszczególnych fragmentów, jak podano w tabeli 5. Reakcje PCR wykonywano na termocyklerze wg procedury podanej w tabeli 7.

Tab. 6. Mieszanina reakcyjna do amplifikacji fragmentów DNA

	Odczynnik	Objętość na 1 próbkę
1	bufor do PCR (x10)	2,5µl
2	dNTP (5mM) (Sigma Aldrich)	0,5µl
3	polimeraza DNA (5U/µl) (Sigma Aldrich)	1µl
4	starter F (5pmol/µl)	1µl
5	starter R (5pmol/µl)	1µl
6	matryca (0,2 µg/µl)	1µl
7	woda	18µl
8	objętość próbki	25µl

Tab.7. Warunki reakcji PCR

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
denaturacja wstępna	94	300
denaturacja	94	30
wiązanie starterów	podano w tabeli 5	30
synteza	72	120
synteza końcowa	72	300
liczba cykli	35	

Produkty reakcji PCR były sprawdzane na żelu agarozowym.

### 3.4. Analiza restrykcyjna

Enzymy restrykcyjne są to endonukleazy, które mają zdolność hydrolizy nici DNA, jeśli w badanym fragmencie znajduje się sekwencja nukleotydów rozpoznawana przez enzym. Sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne to najczęściej kilkunukleotydowe fragmenty, często palindromowe. Hydroliza następuje w obrębie rozpoznawanej sekwencji lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Ta właściwość enzymów restrykcyjnych pozwala na analizowanie występowanie sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny w badanej sekwencji.

Występowanie polimorfizmów może prowadzić do powstawania sekwencji rozpoznawanej przez enzym lub jej zaniku, hydroliza enzymem restrykcyjnym pozwala na szybkie i jednoznaczne określenie, czy taka zmiana sekwencji zaszła.

Amplifikowane fragmenty genu *NOD2*, obejmujące fragmenty zawierające polimorfizmy c.802C>T, c.2104C>T, c.2722G>C, były poddane analizie restrykcyjnej z zastosowaniem odpowiednich endonukleaz, które zestawiono w tabeli 8.

Tab.8. Enzymy restrykcyjne stosowane w identyfikacji badanych polimorfizmów genu *NOD2* oraz wielkości produktów trawienia związane z odpowiednimi genotypami

Polimorfizm	Enzym	Wielkość produktu PCR (pz)	Wielkości produktów hydrolizy (pz)	Genotyp
2104C/T (R702W)	<i>MspI</i> ( <i>Fermentas</i> )	172	51,54,67	C/C
			51,121	T/T
			51,54,67,121	C/T
2722G/C (G908R)	<i>HhaI</i> ( <i>Fermentas</i> )	243	243	G/G
			29,214	C/C
			29,214,243	G/C
802C/T (P268S)	<i>BamH1</i> ( <i>Fermentas</i> )	114	114	C/C
			29,85	T/T
			29,85,114	C/T

#### Procedura

Po amplifikacji fragmentów genów do trawienia enzymem restrykcyjnym stosowano 10µl produktów PCR, do których dodawano 10U enzymu restrykcyjnego oraz 1,25 µl buforu odpowiedniego dla zastosowanego enzymu. Hydrolizę przeprowadzano w temperaturze 37 °C przez noc (16h). Produkty reakcji hydrolizy rozdzielano na żelu agarozowym.

### 3.5 Rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym

Celem rozdziału elektroforetycznego jest sprawdzenie wyniku reakcji PCR, rozdział uzyskanych fragmentów oraz ocena ich wielkości. Jednymi z najbardziej popularnych technik rozdziałów makrocząstek są techniki elektroforetyczne, które pozwalają osiągnąć wysoki poziom rozdzielczości. W elektroforezie wykorzystuje się zjawisko przemieszczania się cząstek o niezerównoważonym ładunku elektrycznym w polu elektrycznym. Wykorzystując zależność prędkości przemieszczania się cząsteczki od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów środowiska, można dokonać szybkiej separacji różnych makrocząsteczek. Nakład kosztów w tej metodzie jest niski, a stosowane urządzenia są proste. Te względy zdecydowały o popularności metody oraz jej szerokim zastosowaniu. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym prowadzono dla sprawdzenia jakości reakcji PCR przed dalszymi analizami oraz analizy długości fragmentów po hydrolizach enzymami restrykcyjnymi.

#### Materiał:

Amplifikowane fragmenty DNA, amplifikowane fragmenty DNA po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi.

#### Procedura

Przygotowano 2,0% żel agarozowy: 2 g agarozy rozpuszczono w 100 ml buforu TBE 1x przez doprowadzenie do wrzenia.

Agarozę schłodzono do ok. 60°C, dodano 5µl bromku etydyny, wymieszano i wylano na przygotowane saneczki. W saneczkach umieszczono grzebień i pozostawiono w temperaturze pokojowej do zastygnięcia.

Przygotowano próbki do rozdziału elektroforetycznego, dodając 3 µl produktu PCR z każdej próbki z 5 µl buforu obciążającego. 5 µl produktów analizy restrykcyjnej mieszano z 8 µl buforu obciążającego.

W kieszonki żelu nałożono próbki oraz marker wielkości. Rozdział prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 min pod napięciem 100V. Po zakończonym rozdziale dokonano wizualizacji wyników oraz oceny wielkości fragmentów DNA. W świetle ultrafioletowym wykonano zdjęcie.

#### Odczynniki:

Agaroz (Sigma Aldrich)

Bufor TBE 1x

Tris (Sigma Aldrich)	89mM
Kwas borowy (Sigma Aldrich)	(Sigma Aldrich)
EDTA (Sigma Aldrich)	2 mM
pH 8,0	

Bromek etydyny

#### Bufor obciążający

fikol (Sigma Aldrich)	15%
błękit bromofenylowy (Sigma Aldrich)	0,25%
cyjanoksylen (Sigma Aldrich)	0,25%

#### Marker wielkości

DNA faga lambda ( $\lambda$ ) trawione enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *HindIII*.  
(przygotowany w laboratorium)

### 3.6 Analiza PCR-SSCP

Analiza PCR-SSCP, czyli badanie polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (ang. Single Strand Conformation Polymorphism), jest jedną z najczęściej stosowanych technik elektroforetycznych umożliwiającą wykrywanie punktowych zmian w DNA. W praktyce najlepsze wyniki, ponad 95% wykrywalność zmian, uzyskuje się dla fragmentów DNA o wielkości 100-300 pz. Metoda opiera się na denaturacji termicznej produktów reakcji PCR z dodatkiem czynnika denaturującego, szybkim schłodzeniu, a następnie ich rozdziale w natywnym żelu poliakryloamidowym. W warunkach niedenaturujących jednoniciowe struktury tworzą wewnętrzne sparowania prowadzące do przyjęcia określonej konformacji przez pojedyncze nici DNA. Fragmenty o tej samej długości i sekwencji tworzą takie same konformery. Zmiana w sekwencji lub długości amplifikowanego fragmentu prowadzi do powstania odmiennego konformera, charakteryzującego się odmienną ruchliwością elektroforetyczną. Różnice w migracji konformerów uwidocznione są na żelu po przeprowadzeniu detekcji DNA metodą wybarwienia przy pomocy azotanu srebra. W czasie analizy jest możliwe powiązanie określonego wzoru tworzonego przez prążki w analizie SSCP z genotypem. Umożliwia to szybkie i tanie genotypowanie dużej liczby próbek.

#### Reakcja PCR

Reakcje PCR do analizy SSCP przeprowadzono tak, jak opisano w tabelach 6 i 7.

Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakryloamidowym w analizie PCR-SSCP.

Do 3  $\mu$ l produktu reakcji PCR dodano 5  $\mu$ l buforu obciążającego, następnie denaturowano termicznie w 95°C przez 5 min. Po denaturacji próby schładzano na lodzie, a następnie nałożono na żel poliakryloamidowy.

Żel poliakryloamidowy:

10%, akrylamid (POCH): bisakrylamid (POCH) (49: 1)  
1x TBE

Na 80ml roztworu dodano 800µl TEMED (Sigma Aldrich) i 80 µl 10% APS (Sigma Aldrich).

Bufor obciążający:

formamid z dodatkiem 0,1% błękit bromofenolowy (Sigma Aldrich)

Bufor do elektroforezy:

0,5x TBE

Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy napięciu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. Zastosowaną metodą detekcji DNA w żelu poliakryloamidowym było srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Po zakończeniu procedury srebrzenia żele zostały wysuszone na bibule Whatman.

### 3.7 Analiza heterodupleksów

Analiza heterodupleksów (PCR-HD) jest jedną z przesiewowych metod wykrywania mutacji i polimorfizmów[125, 126]. Daje dobre rezultaty w badaniu fragmentów dłuższych niż 200. W czasie powolnej renaturacji wcześniej zdenaturowanych produktów PCR z mutacją w układzie heterozygotycznym dochodzi do hybrydyzacji nie tylko w pełni komplementarnych nici – te nie w pełni komplementarne nici również hybrydują i tworzą heterodupleks. Niesparowany odcinek DNA w zależności od typu mutacji oraz stężenia czynników denaturujących może tworzyć „pęcherzyk”, wyrzucenie lub zgięcie nici DNA. Metoda nadaje się do wykrywania mutacji, jak i polimorfizmów występujących w układzie heterogennym, w przypadku chorób dziedzicznych w układzie homozygotycznym do mieszaniny reakcyjnej należy dodać prawidłowego DNA[127, 128].

Reakcja PCR

Reakcje PCR do analizy heterodupleksów przeprowadzono tak, jak opisano w tabelach 6 i 7.

Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakryloamidowym w analizie PCR- HD

4µl poszczególnych produktów reakcji PCR zmieszano z 4 µl buforu obciążającego. Mieszaninę denaturowano przez 5 minut w 95 °C, a następnie inkubowano w 65°C przez 60 min w celu utworzenia heterodupleksów. Rozdział produktów PCR prowadzono przez 16 godzin w 10% żelu poliakryloamidowym przy natężeniu 4 Amperów.

Bufor obciążający:

20% glikol etylenowy (Fluka)  
30% formamid (Sigma Aldrich)  
0,5% błękit dekstranu (Sigma Aldrich)

Żel poliakryloamidowy:

10% roztwór akrylamid:bisakrylamid (29:1)  
1x TBE  
na 100 ml roztworu dodano 1 ml 10% APS (Sigma Aldrich) i 100  $\mu$ l  
TEMED(Sigma Aldrich) .

Jako metodę detekcji zastosowano barwienie DNA azotanem srebra. Po wykonaniu procedury srebrzenia żele zostały wysuszone.

### 3.8 Detekcja DNA azotanem srebrem

Barwienie DNA srebrem jest wydajną i czułą metodą detekcji DNA w żelach poliakryloamidowych. Umożliwia detekcję 1-10 pg DNA na  $\text{mm}^2$ . Jest to technika fotochemiczna, podobna do reakcji wykorzystywanych w fotografii. Reakcję przeprowadza się w trzech etapach. Pierwszym etapem jest przygotowanie żelu po elektroforezie, polegającym na umieszczeniu żelu w etanolu. Celem zabiegu jest odwodnienie żelu, wskutek czego łatwiej reaguje z kolejnymi odczynnikami, jednocześnie następuje utrwalenie DNA w żelu. Kolejnym etapem jest utlenianie DNA kwasem azotowym. Barwienie DNA przeprowadza się poprzez inkubację żelu w azotanie srebra z dodatkiem formaldehydu redukującego srebro do formy metalicznej wiążącej się z DNA. Dodanie węglanu sodu powoduje uwidocznienie prążków w żelu. Reakcję wywoływania prowadzi się stopniowo, do uzyskania optymalnej intensywności prążków. Reakcję uwidaczniania prążków przerywa się, obniżając pH poprzez dodanie kwasu octowego. Następnie inkubacja żelu w kwasie ma na celu jego utrwalenie[126].

Procedura

- A. Po elektroforezie żel inkubowano w roztworze 10% etanolu przez 15 min. Następnie usunięto roztwór etanolu i przepłukano żel wodą.
- B. Dodawano 500 ml 1% kwasu azotowego, inkubowano przez 10 min., kwas usuwano i przepłukiwano żel wodą.
- C. Do 500 ml 0,2% azotanu srebra dodawano 500  $\mu$ l formaldehydu, po wymieszaniu wlewano do naczynia z żelem i inkubowano przez 30 min. Po usunięciu azotanu srebra żel płukano kilkakrotnie wodą.



D. Wywołanie przeprowadzono poprzez przepłukiwanie 3% roztworu węglanu sodu, z dodatkiem formaldehydu (1ml formaldehydu na 1l roztworu węglanu sodu).

E. Reakcję wywołania zatrzymywano przez dodanie 10% roztworu kwasu octowego.

F. Żel przeniesiono na wilgotną bibułę Whatman i przykrywano zwilżoną folią celofanową, następnie suszono w suszarce próżniowej w temp. 80°C przez 45 min.

Stosowane odczynniki:

- 10% etanol (POCH)
- 1% kwas azotowy (POCH)
- 0,2% azotan srebra (POCH)
- 3% węglan sodu (POCH)
- formaldehyd (POCH)
- 10% kwas octowy (POCH)

### 3.9. Analizy HRM

Jedną z nowocześniejszych technik stosowanych w badaniach przesiewowych, która pozwala wykrywać małe zmiany sekwencji w obrębie badanych fragmentów, jest analiza topnienia w wysokiej rozdzielczości (ang. *High Resolution Melting* – HRM). Zasada działania metody opiera się na monitorowaniu zachowania wcześniej zamplifikowanych fragmentów DNA w trakcie procesu denaturacji. Analizę umożliwia obecność barwnika fluorescencyjnego w mieszaninie reakcyjnej, który interkaluje jedynie dwuniciowy DNA, dając silny sygnał fluorescencyjny, dzięki czemu możliwa jest obserwacja procesu topnienia, to znaczy przejścia dwuniciowego DNA w jednoniciowe DNA w trakcie denaturacji. Porównując ze sobą profile topnienia poszczególnych fragmentów, możliwe jest wyselekcjonowanie tych wykazujących różnice w przebiegu denaturacji, które odzwierciedlają tym samym zmiany w sekwencji. HRM jest techniką przesiewową i nie pozwala uzyskać dokładnych informacji na temat zmian w sekwencji, dlatego wszystkie nietypowe profile topnienia wymagają potwierdzenia sekwencjonowaniem. Jednakże wysoka czułość metody, sięgająca wg niektórych badań 100%, pozwala znacznie zredukować liczbę sekwencjonowań, a tym samym koszty analiz, przy jednoczesnym zachowaniu (a nawet zwiększeniu) skuteczności wykrywania mutacji w porównaniu do starszych metod przesiewowych.

Analizę HRM zastosowano dla wykrywania alleli w c.802C>T (p.P268S), c.2104C>T (p.R702W), c.2722G>C (p.G908R), 3020insC w genie *NOD2*, z wykorzystaniem starterów z tabeli 5. Za pomocą HRM wykrywano warianty *SLC22A4*, *SLC22A5* w locus 5q31 z zastosowaniem starterów, jak w tabeli 5. Analizę materiału prowadzono przez 3 lata w trakcie projektu IGCz.

PAN pozyskał aparat do analizy HRM, w związku z tym część analiz przeprowadzono z zastosowaniem nowej metodyki.

#### Procedura HRM

Amplifikację wybranych fragmentów wykonywano w termocyklerze z detekcją fluorescencji i możliwością prowadzenia topnienia w wysokiej rozdzielczości 0,02 °C /sek.

Mieszaninę reakcyjną przygotowano wg tabeli 9 z zastosowaniem zestawu do analizy HRM type-it HRM PCR kit Qiagen, starterów do amplifikacji poszczególnych fragmentów (jak podano w tabeli 5). Reakcje PCR wykonywano na termocyklerze wg procedury podanej w tabeli 10.

Tab. 9. Mieszanina reakcyjna do amplifikacji fragmentów DNA do analizy HRMA

	Odczynnik	Objętość na 1 próbkę
1	mieszanina reakcyjna (x2)	10µl
4	starter F (5pmol/µl)	2,8 µl
5	starter R (5pmol/µl)	2,8 µl
6	matryca (0,05 µg/µl)	1µl
7	woda	3,4 µl
8	objętość próbki	20µl

Tab.10. Warunki reakcji PCR dla analizy HRM

Etap	Temperatura (°C)	Czas (s)
Denaturacja wstępna	90	300
Denaturacja	94	10
Wiązanie starterów	55	30
Synteza	72	10
Liczba cykli	40	

Produkty reakcji PCR były „topione” w aparacie do HRM w zakresie temperatur od 75°C do 95°C w gradiencie temperatury z rozdzielczością 0,02°C z 2 sekundowymi okresami oczekiwania po każdym stopniu

### 3.10 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowaniu poddano te fragmenty, gdzie w analizie PCR-HD lub PCR-SSCP zaobserwowano wystąpienie heterodupleksów dających odmienny wzór, albo dla potwierdzenia wyników analizy restrykcyjnej lub HRMA. Sekwencjonowanie przeprowadzono metodą enzymatyczną Sangera.

Istotą tej metody jest replikacja jednoniciowej matrycy, rozpoczynająca się od jednego startera, przy zastosowaniu polimerazy DNA oraz trifosforanów dideoksyrybonukleotydów (ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP). Brak grupy hydroksylowej w pozycji 3' rybozy terminatora uniemożliwia tworzenie wiązania fosfodiesterowego i wbudowanie kolejnego deoksynukleotydu do syntetyzowanego łańcucha DNA[129-133].

Reakcję replikacji przeprowadzano w probówce zawierającej, poza podstawowymi składnikami mieszaniny reakcyjnej (matryca, starter, mieszanina czterech dNTP, bufor, polimeraza DNA), cztery typy znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów o stężeniu dobranym tak, aby uzyskać cały zestaw fragmentów, zakończonych w każdej możliwej pozycji syntetyzowanej nici DNA. Każda cząsteczka, do której został włączony terminator, jest wyznakowana barwnikiem fluorescencyjnym przyłączonym do danego ddNTP. Jako matrycę zastosowano uzyskane we wcześniejszych etapach badań produkty PCR. Mieszaninę uzyskanych w ten sposób znakowanych fragmentów DNA rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej, po uprzednim usunięciu niewykorzystanych cząsteczek startera, dNTP i ddNTP i zawieszeniu w buforze do nakładania prób (70% formamid, 1 mM EDTA). Rozdział przeprowadzano na sekwenatorze kapilarnym, ABI 3730 (Applied Biosystems), rejestrującym sygnały o czterech długościach światła, przy napięciu 9000 V, w czasie 100 minut. Do analizy wyników sekwencjonowania zastosowano program Chromas.

Mieszaninę reakcyjną przygotowano jak w tabeli 11, warunki reakcji sekwencjonowania podano w tabeli 12.

Tab. 11. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składniki	Objętość na 1 próbkę (μl)
Mieszanina reakcyjna	2
Starter 5pM/μl	1
Oczyszczony produkt PCR	2
Woda	5
Razem	10

Tab. 12. Warunki reakcji sekwencjonowania

Etapy	Temperatura (°C)	Czas (s)
Denaturacja	94	20
Wiązanie startera	55	30
Wydłużanie startera	60	150
Liczba cykli	25	

#### 4. Analizy statystyczne

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy pomocy testu chi-kwadrat ( $\chi^2$ ) i dokładnego testu Fishera

## IV. WYNIKI

Zgromadzono do badań materiał w postaci DNA z krwi obwodowej od 100 chorych ze zdiagnozowanym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano dane charakteryzujące badaną grupę chorych pod względem populacyjnym, klinicznym oraz genetycznym.

### 1. Dane populacyjne

Do badań zakwalifikowano 100 chorych leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej w latach 2007-2011.

#### 1.1. Płeć i wiek postawionej diagnozy

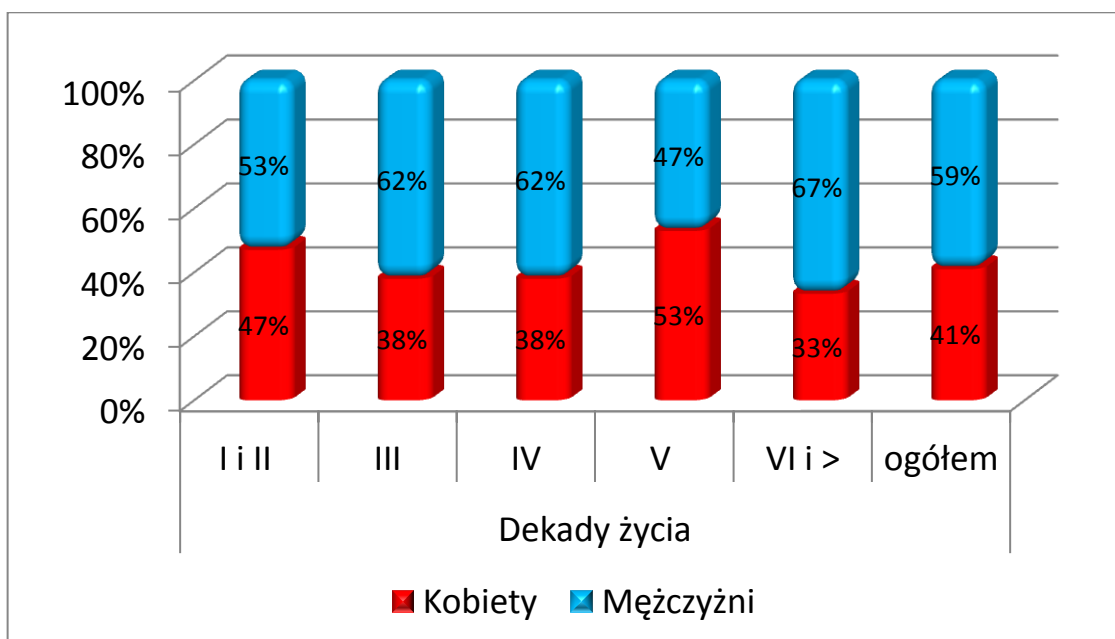
W badanej grupie było 41 kobiet i 59 mężczyzn – różnica ta nie jest statystycznie istotna w dokładnym teście Fishera. Średnia wieku, w którym u pacjenta zdiagnozowano chorobę w badanej grupie, to 35 lat.

Najwcześniej zdiagnozowany pacjent był w wieku 6 lat, a najstarszy w wieku 71 lat. Nie stwierdzono istotnych różnic w średnim wieku postawienia diagnozy u kobiet i u mężczyzn (Tab.13). Również procentowy rozkład zachorowań w poszczególnych dekadach życia u obu płci nie wykazał istotnych różnic i obrazował procentowy rozkład oby płci w badanej populacji. Jedynym odstępstwem jest piąta dekada życia, gdzie obserwowano częstsze rozpoznanie choroby u kobiet niż u mężczyzn, mimo ich przewagi w badanej grupie (Ryc.5, Tab.15). Przy tej liczebności grupy, po rozbiciu jej na płeć i dodatkowe grupy związane z wiekiem zachorowania, ocena statystyczna nie jest możliwa.

Tab. 13. Charakterystyka populacyjna badanej grupy

	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
Liczebność	41	59	100
Postawienie diagnozy - średnia wieku pacjenta (w latach)	35	35	35
Postawienie diagnozy - zakres wieku pacjentów (w latach)	13-68	12-71	12-71

Ryc.5. Procentowy rozkład zachorowań wg płci w poszczególnych dekadach życia



## 1.2. Leczenie operacyjne

Wdrożone leczenie operacyjne pacjentów w korelacji z ich wiekiem oraz wiekiem postawienia diagnozy CU przedstawiono łącznie w tabeli 14. Leczenie operacyjne wdrożono średnio po 6 latach od postawienia diagnozy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Średni wiek operowanego pacjenta był również podobny u obu płci (odpowiednio 41 lat u kobiet, 45 lat u mężczyzn i 41 lat w całej badanej populacji).

Tab.14. Leczenie operacyjne w korelacji z wiekiem pacjenta i wiekiem postawienia diagnozy

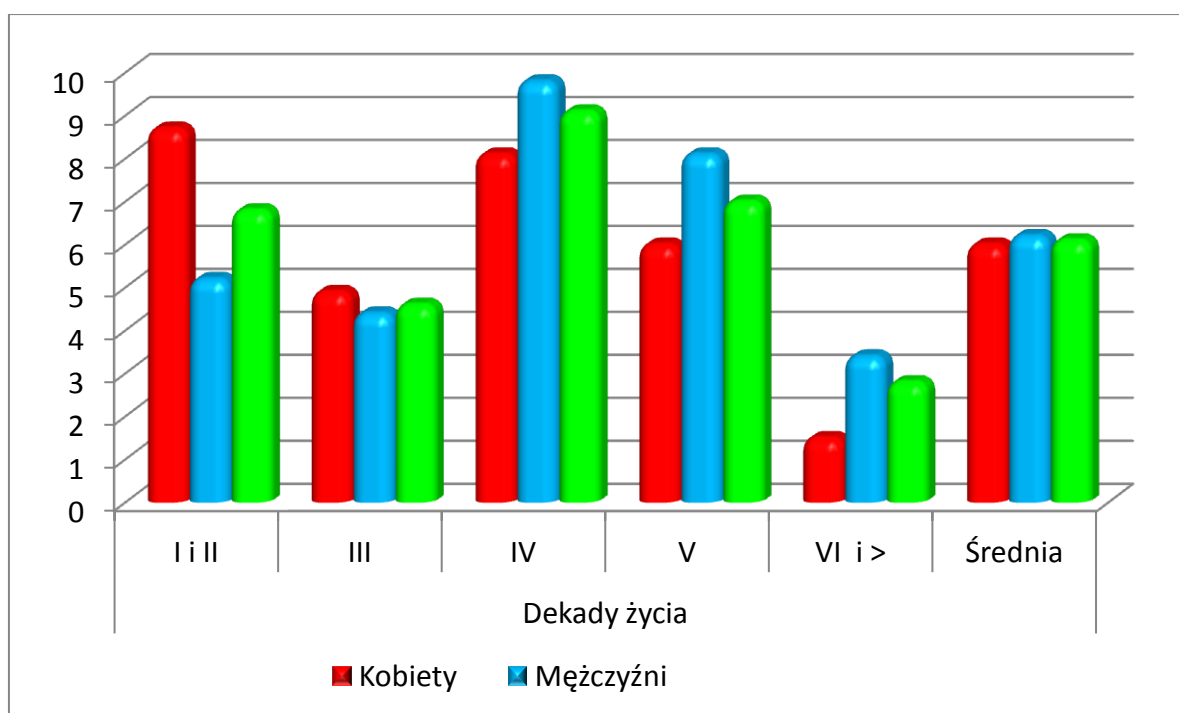
	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
Leczenie operacyjne - średni wiek pacjenta (w latach)	41	45	41
Leczenie operacyjne - zakres wieku pacjentów (w latach)	18-68	8-71	8-71
Czas od rozpoznania do operacji (w latach)	0-23	0-26	0-26
Średni czas od rozpoznania do operacji (w latach)	6	6	6

Rozpiętość wieku operowanego pacjenta, jak również rozpiętość czasu między postawieniem diagnozy a wykonanym zabiegiem operacyjnym była bardzo duża. Najmłodszy operowany pacjent miał 8 lat, a najstarszy 71. Część

pacjentów, przyjmowanych do oddziału w trybie ostrym, było operowanych natychmiast po postawieniu diagnozy ze względu na wskazania pilne bądź nagłe do wykonania kolektomii. Druga grupa pacjentów – głównie ze wskazaniami wybiórczymi do operacji – była operowana nawet po 26 latach od postawienia diagnozy.

Na rycinie 6 oraz w tabeli 15 przedstawiono rozkład okresów od diagnozy CU do czasu wykonania operacji. Zwraca uwagę znaczna różnica w długości tego okresu. Przy diagnozowaniu CU po 50 roku życia okres ten był bardzo krótki, o ponad połowę krótszy niż średnia dla badanej grupy. Natomiast pacjenci diagnozowani w IV i V dekadzie charakteryzowali się dłuższym okresem od rozpoznania do operacji.

Ryc.6. Okres od postawienia diagnozy do operacji w zależności od dekady życia pacjenta, w której diagnoza została postawiona





Tab.15. Częstość zachorowania w poszczególnych dekadach życia z uwzględnieniem płci oraz czasu od postawienia diagnozy choroby do zabiegu operacyjnego

Dekada zachorowania	I i II	III	IV	V	VI i >	Razem
Kobiety	8 (47%)	9 (37%)	9 (37%)	9 (53%)	6 (33%)	41 (41%)
Mężczyźni	9 (53%)	15 (63%)	15 (63%)	15 (47%)	12 (67%)	59 (59%)
Razem	17	24	24	17	18	100
Okres od postawienia diagnozy do operacji (lata)						
Kobiety	8,7	4,9	8,1	6	1,5	6,0
Mężczyźni	5,2	4,4	9,8	8,1	3,4	6,2
Razem	6,8	4,6	9,1	7	2,8	6,1

## 2. Dane Kliniczne

U każdego pacjenta włączonego do grupy badanej przeprowadzono wnikliwe badanie podmiotowe, przedmiotowe oraz analizę dostępnych badań dodatkowych, ze szczególnym naciskiem na badanie endoskopowe. Pod uwagę brano ostatnie badanie endoskopowe przed kwalifikacją do zabiegu operacyjnego. W części przypadków było to badanie wykonane w Pracowni Endoskopii Szpitala im. J.Strusia w Poznaniu, w którym umiejscowiona jest Klinika Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej. W przypadku, kiedy badanie endoskopowe nie było wykonane podczas bieżącej hospitalizacji, brano pod uwagę ostatnie badanie endoskopowe, z którym pacjent trafił do szpitala.

### 2.1. Klasyfikacja montrealaska

U każdego pacjenta została oceniona cecha E oraz S klasyfikacji montrealaskiej. Cecha „E” oceniana była na podstawie ostatniego badania endoskopowego, cecha „S” zaś na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego oraz badań laboratoryjnych. Łącznie wyniki przedstawiono w tabeli 16, różnicując je dodatkowo w zależności od płci pacjenta. Większość pacjentów (90%) była kwalifikowana do leczenia operacyjnego ze zmianami chorobowymi w całym jelicie grubym. Ponad połowę pacjentów oceniono jako umiarkowany rzut CU w skali ciężkości rzutu choroby (S2), ale cecha ta była bardzo zmienna w zależności od trybu postępowania operacyjnego (S1 i S2 w trybie wybiórczym, S2 i S3 w trybie pilnym i nagłym).

Tab.16. Klasyfikacja montrealaska badanej grupy chorych

	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
E2	4 (9,8%)	6 (10%)	10 (10%)
E3	37 (90,2%)	53 (90%)	90 (90%)
S1	9 (22%)	12 (20,3)	21 (21%)
S2	21 (51,2%)	34 (57,6%)	55 (55%)
S3	11 (26,8%)	13 (22%)	24(24%)

## 2.2. DAI Score

Współczynnik DAI (Disease Activity Index) został określony u każdego pacjenta na podstawie wywiadu, oceny ogólnej pacjenta oraz ostatniego badania endoskopowego przed zabiegiem operacyjnym. Poszczególne wartości punktowe tego współczynnika w badanej grupie chorych, z uwzględnieniem płci pacjenta, zostały przedstawione w tabeli 17. W tym przypadku również zwraca uwagę zależność między trybem przeprowadzanego leczenia operacyjnego a wartością współczynnika DAI (wyższe wartości w przypadku wskazań pilnych i nagłych do leczenia operacyjnego).

Tab.17. DAI Score badanej grupy chorych przy kwalifikacji do zabiegu

	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
6 pkt	1 (2,4%)	5 (8,5%)	6 (6%)
7 pkt	12 (29,3%)	13 (22%)	25 (25%)
8 pkt	6 (14,6%)	8 (13,6%)	14 (14%)
9 pkt	2 (4,9%)	8 (13,6%)	10 (10%)
10 pkt	9 (22%)	12 (20,3%)	21 (21%)
11 pkt	10 (24,4%)	9 (15,3%)	19 (19%)
12 pkt	1 (2,4%)	4 (6,8%)	5 (5%)
Średnia punktowa	9 pkt	8,9pkt	8,9 pkt

## 2.3. Powikłania pozajelitowe

U 11 pacjentów (11% całej grupy badanej – 5 kobiet (12%) oraz 6 mężczyzn (6,7%)) na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego oraz dostępnej dokumentacji medycznej stwierdzono powikłania pozajelitowe charakterystyczne dla CU. U 3 chorych stwierdzono zgorzelinowe zapalenie skóry, u kolejnych 3 zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa. U pozostałych chorych zdiagnozowano zapalenie tęczówki, zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych oraz pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych.

## 2.4. Nowotwory

W badaniu histopatologicznym wyciętego podczas zabiegu operacyjnego jelita nowotwory stwierdzono u 5 pacjentów – 1 kobiety i 4 mężczyzn. U jednego pacjenta stwierdzono nowotwór synchroniczny – w odbytnicy i kątnicy. U dwóch chorych nowotwór umiejscowiony był tylko w odbytnicy, u pozostałych dwóch w kątnicy i w poprzecznicy.

## 2.5. Leczenie operacyjne

Wszyscy włączeni do badania pacjenci mieli wykonany zabieg operacyjny. U 99 z nich wykonano proktokolektomię odtwórczą z wytworzeniem zbiornika „J” z jelita krętego wraz z ileostomią protekcyjną, którą likwidowano średnio po trzech miesiącach od pierwszego zabiegu. U jednego pacjenta wykonano proktokolektomię z wyłonieniem ileostomii końcowej. Większość pacjentów kwalifikowanych było do zabiegu operacyjnego w trybie planowym z powodu wskazań wybiórczych, jak długotrwała wyniszczająca choroba, niereagująca na leczenie zachowawcze, manifestacje pozajelitowe CU oraz podejrzenie przemiany nowotworowej. Druga grupa pacjentów to chorzy z wskazaniami pilnymi lub nagłymi trafiający do szpitala najczęściej w ramach ostrego dyżuru lub przekierowywani w trybie pilnym z innych oddziałów chirurgicznych bądź internistycznych. Wskazaniami pilnymi były ostre, niepoddające się intensywnemu leczeniu rzuty choroby, a wskazaniami nagłymi masywne krwawienie, wstrząs septyczny i *megacolon toxicum*.

W tabeli 18 przedstawiono łączne zestawienie badanej grupy pacjentów, z uwzględnieniem płci pacjenta, w zależności od trybu wykonania zabiegu operacyjnego. Uwzględniono w niej również średnią wieku pacjenta, w której została postawiona diagnoza, oraz średni czas między postawieniem diagnozy a operacją.

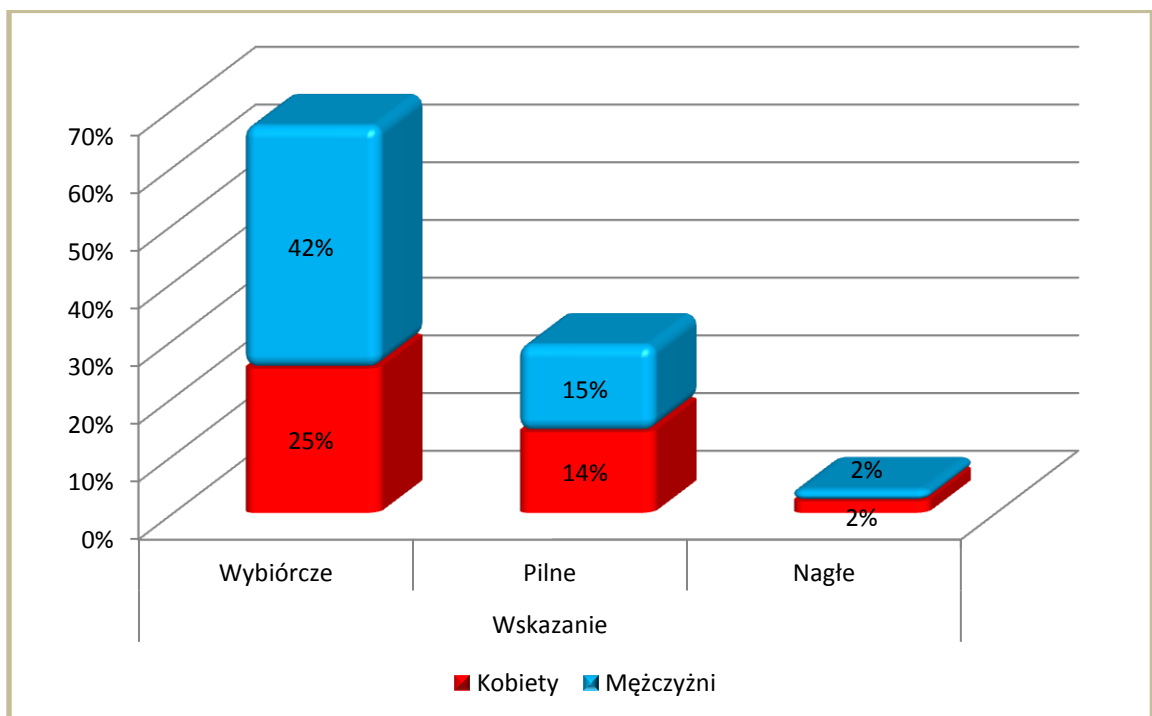
Tab.18. Zestawienie grup pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego

	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
Wskazanie	<b>Wybiórcze</b>		
Liczba pacjentów	25	42	67
Średnia wieku pacjenta przy postawieniu diagnozy	31	36,7	34,7
Czas do operacji (w latach)	9,2	8,3	8,6
Wskazanie	<b>Pilne</b>		
Liczba pacjentów	14	15	29
Średnia wieku	44,3	30	40
Czas do operacji (w latach)	1,4	1	1
Wskazanie	<b>Nagle</b>		
Liczba pacjentów	2	2	4
Średnia wieku	17,5	46	32,5
Czas do operacji (w latach)	3	0	1,5

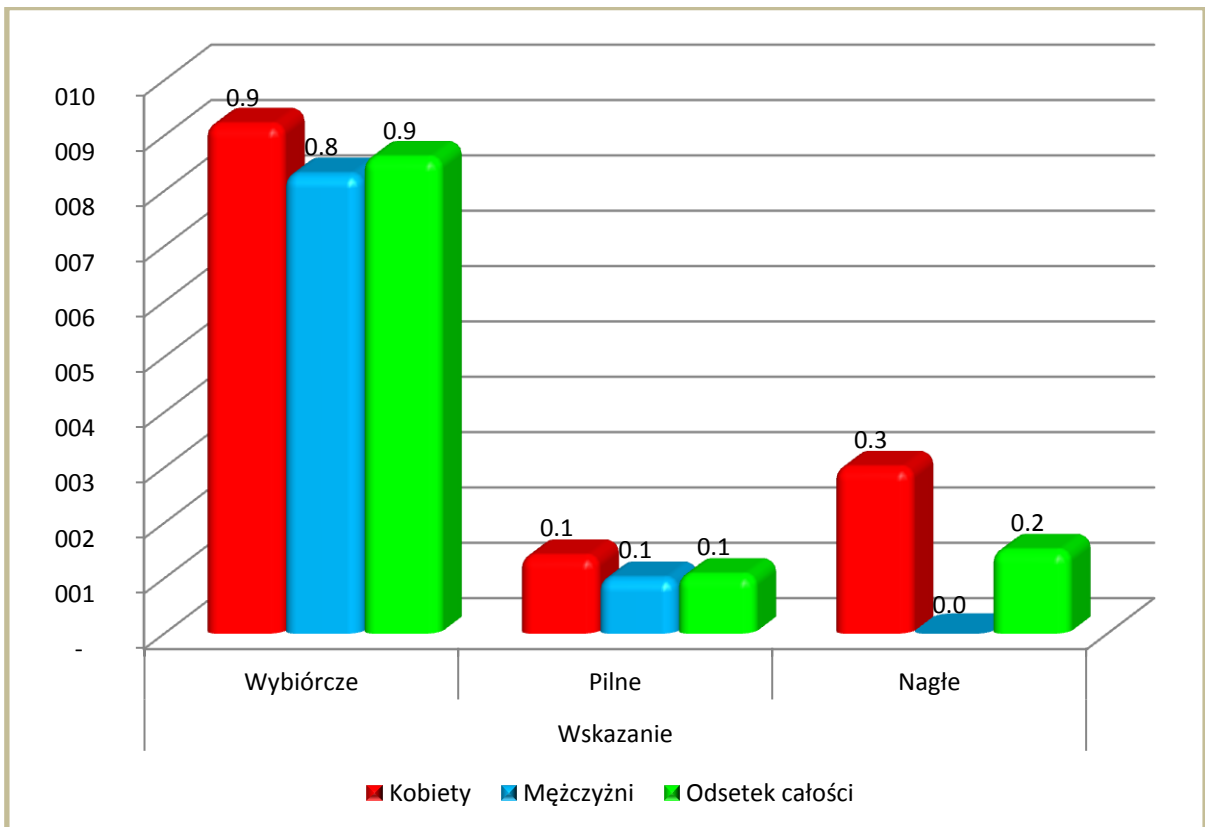
Na rycinie 7 oraz 8 obrazowo przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych wskazań do zabiegu operacyjnego w badanej grupie chorych oraz czas między zabiegiem operacyjnym a postawioną diagnozą, z uwzględnieniem płci pacjenta. Znaczna większość pacjentów była operowana

ze wskazań wybiórczych (67%). Okres między postawieniem diagnozy a operacją w grupie chorych ze wskazaniami wybiórczymi do operacji jest znacznie dłuższy w porównaniu z grupą chorych operowanych ze wskazań pilnych bądź nagłych (odpowiednio 8,6 lat do 1 i 1,5 roku). W przypadkach pilnych i nagłych wskazań do operacji można mówić o bardzo ostrym przebiegu choroby i niepowodzeniu leczenia farmakologicznego. Rozpoznanie w wielu przypadkach przeprowadzono bezpośrednio przed kwalifikacją do zabiegu.

Ryc.7. Procentowy odsetek poszczególnych wskazań do leczenia operacyjnego



Ryc.8. Okresy od postawienia diagnozy CU do zabiegu operacyjnego w latach



### 3. Badania molekularne

Wykonano badania molekularne w 4 genach. Określono częstości występowania alleli w genach *NOD2* oraz *SLC22A4* i *SLC22A5*. Przeanalizowano sekwencje kodującą genu *HPGD* z zastosowaniem metod poszukiwania mutacji PCR-SSCP i PCR-HD. W przypadku wykrycia heterodupleksów lub zmian w układzie prążków w SSCP wykonano sekwencjonowanie takiego fragmentu.

#### 3.1. Badanie molekularne genu *NOD2*

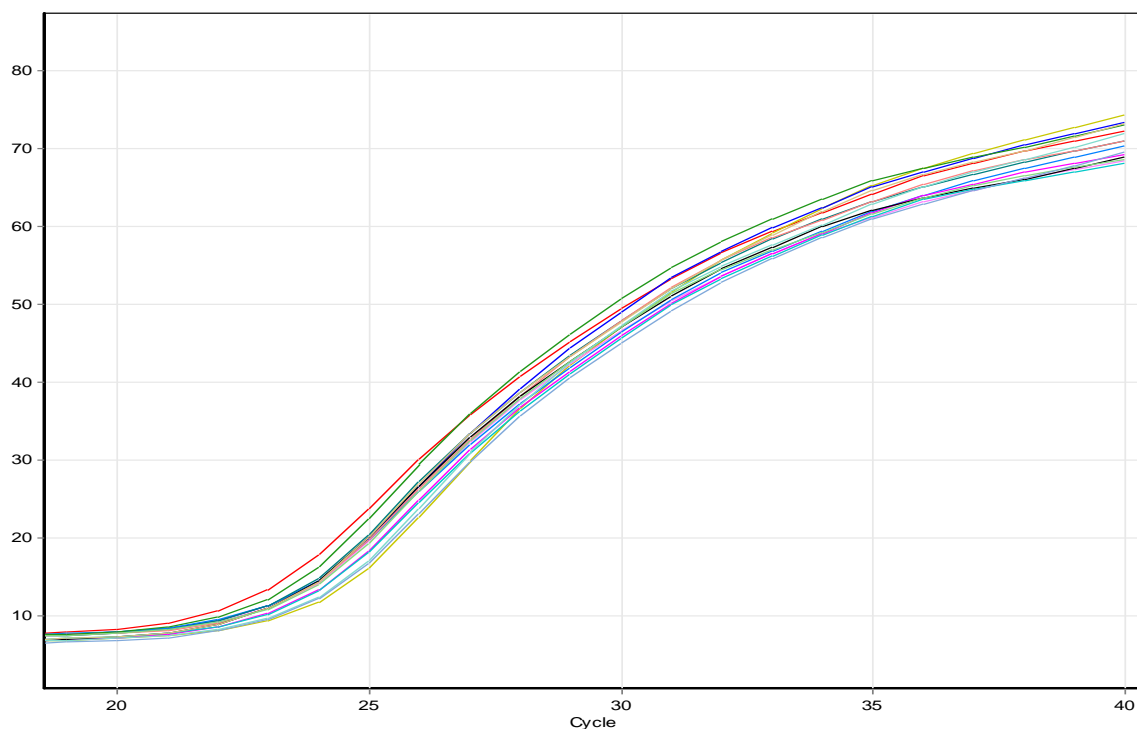
Badanie molekularne genu *NOD2* polegało na określeniu częstości występowania czterech wariantów genetycznych. W badanej grupie 100 pacjentów oraz w 154 osobowej grupie kontrolnej określono częstości występowania wariantów c.3020insC, c.802C>T c.2104C>T, c.2722G>C. Badania wykonano z zastosowaniem HRM lub analizy restrykcyjnej.

##### 3.1.1. Badanie występowania c.3020insC

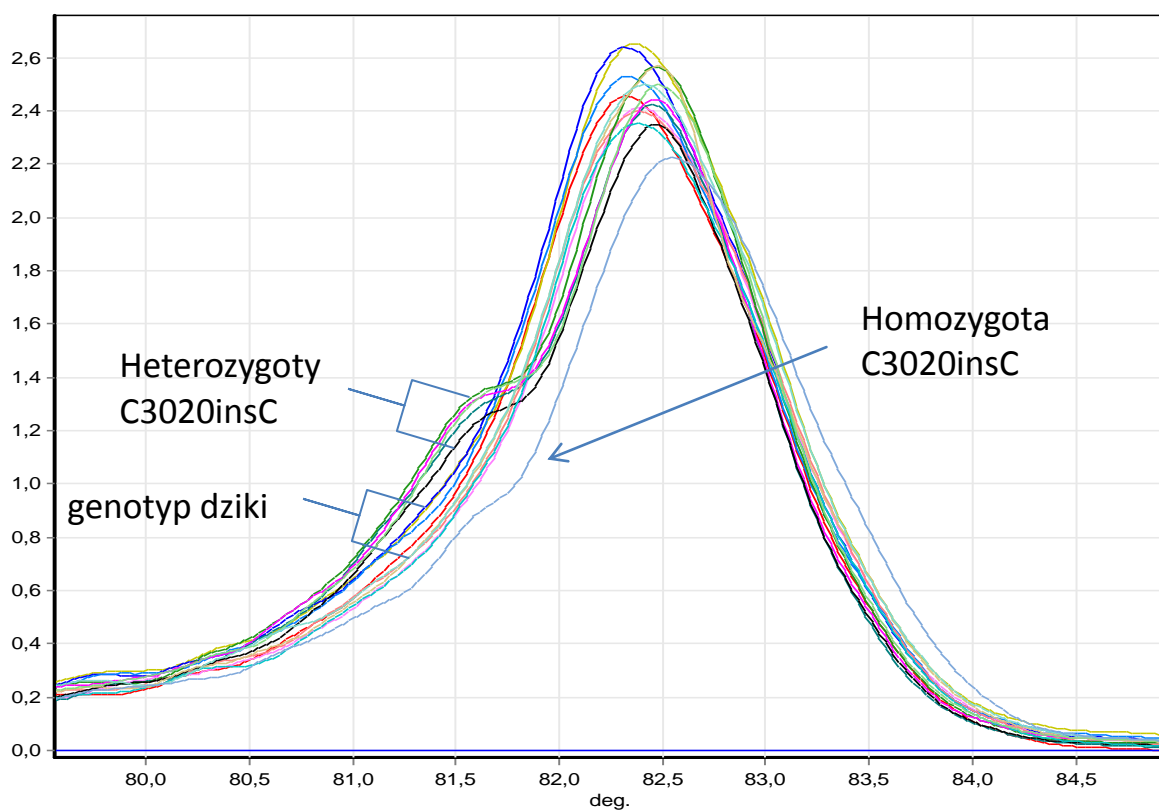
Badanie częstości występowania c.3020insC w genie *NOD2* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.3020insC został amplifikowany w reakcji PCR (Ryc.10) Następnie amplifikowany produkt PCR został stopiony w gradiencie temperatury, w wyniku czego otrzymano profile topnienia dla poszczególnych próbek. W przypadku analizy c.3020insC już na podstawie profili topnienia można wskazać występujące genotypy (Ryc.10). W dalszej części analizy program konwertuje krzywe profili topnienia na wykresy szybkości topnienia (Ryc.11), co po wyprowadzeniu pochodnych i przydzieleniu odpowiednich genotypów dla próbek o znanych genotypach umożliwia różnicowanie poszczególnych krzywych względem próby wzorcowej (Ryc.12). W części przypadków identyfikację alleli c.3020insC przeprowadzono na podstawie analizy układu prążków w badaniu PCR-SSCP (Ryc.13).

W badanych grupach częstości insercji w badanym locus nie różnią się znacznie. Liczba heterozygot c.3020insC była o 2 % wyższa u pacjentów niż w grupie kontrolnej. Również częstość allela c.3020insC była o 2% wyższa w grupie pacjentów (Ryc.14 i 15; Tab.11 i 12). Różnice te nie są statystycznie istotne. W tabelach 19 i 20 przedstawiono częstości występowania tego wariantu z podziałem grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu. Dla uproszczenia wydzielono grupę ze wskazaniami wybiórczymi oraz połączono grupy ze wskazaniami pilnymi i nagłymi z uwagi na to, że grupa kwalifikowana z powodu wskazań nagłych nie jest liczna (Tab.18). Ponadto obie grupy pacjentów wymagały dość szybkiej interwencji chirurgicznej, wobec tego takie połączenie nie zaburzy ewentualnych obserwacji. W przypadku c.3020insC nie zaobserwowano różnic w częstościach występowania poszczególnych genotypów, ale częstość allela z insercją była w grupie pacjentów ze wskazaniami wybiórczymi do operacji o 5% wyższa, jednak statystycznie nieistotna (Tab.20).

Ryc.9. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.3020insC

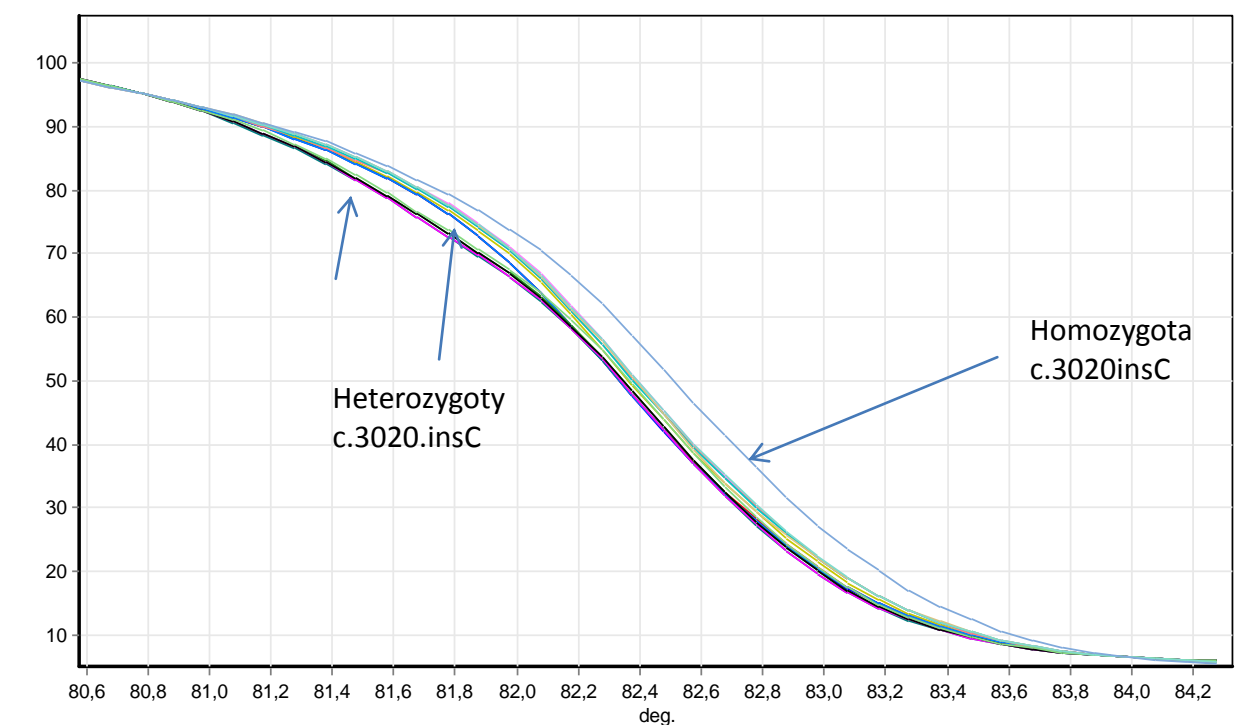


Ryc.10. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC w badanej grupie pacjentów

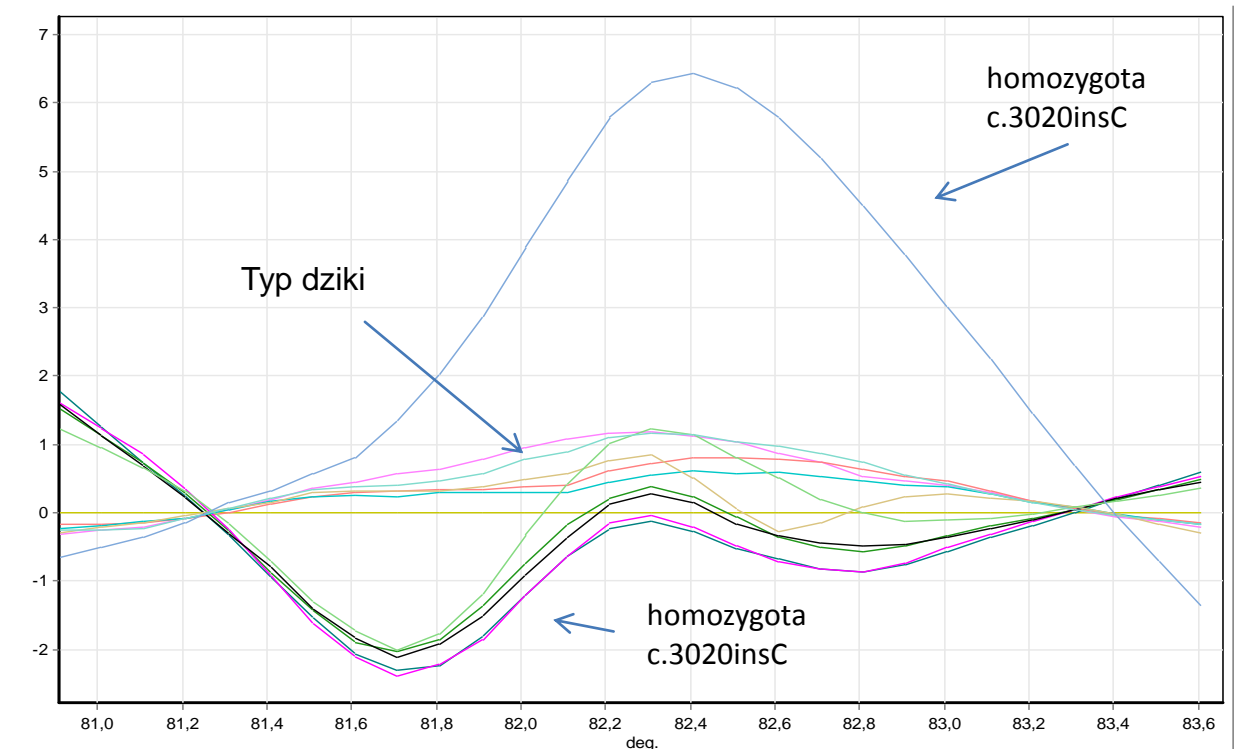




Ryc.11. Wykresy szybkości topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC

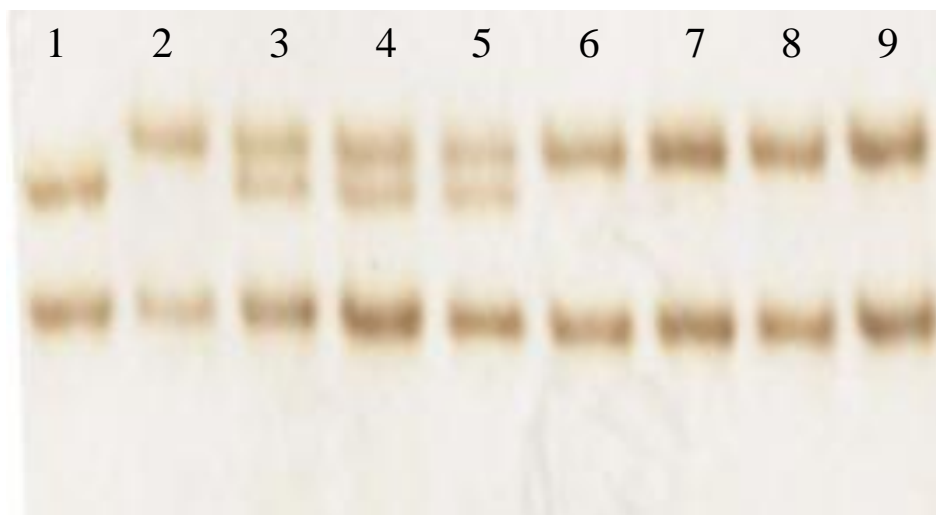


Ryc.12. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC

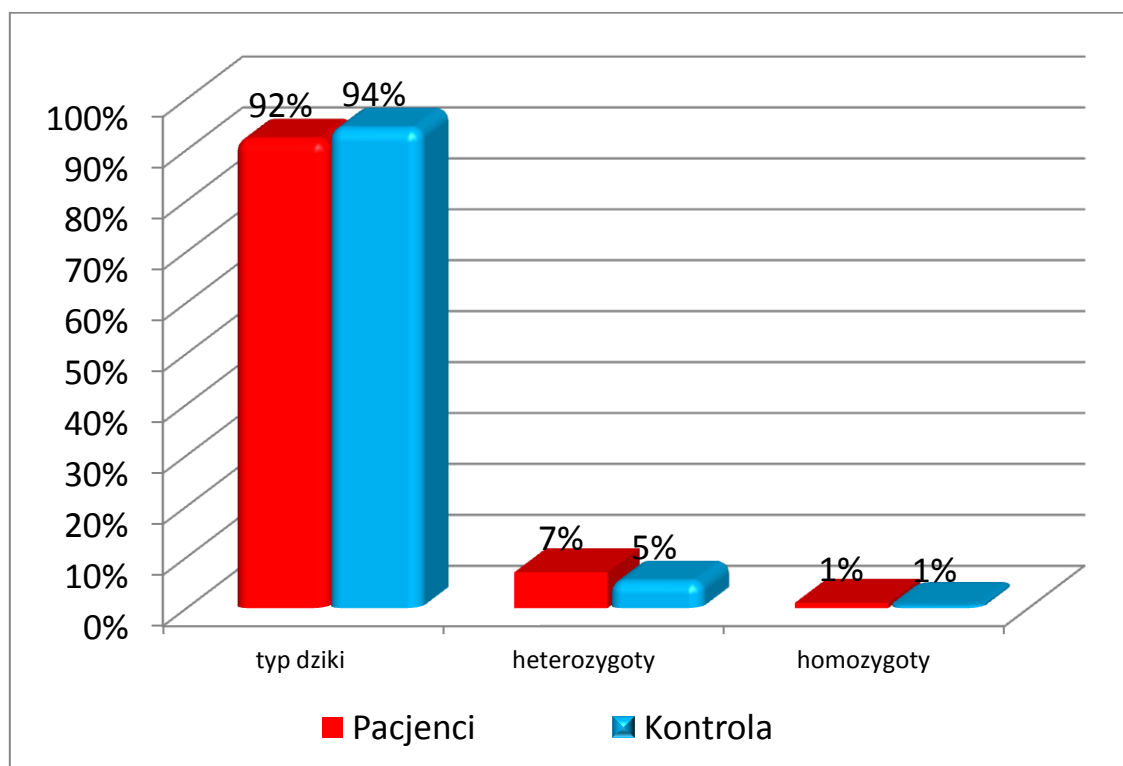


Ryc.13. Analiza PCR-SSCP dla fragmentu genu *NOD2* obejmującego c.3020insC

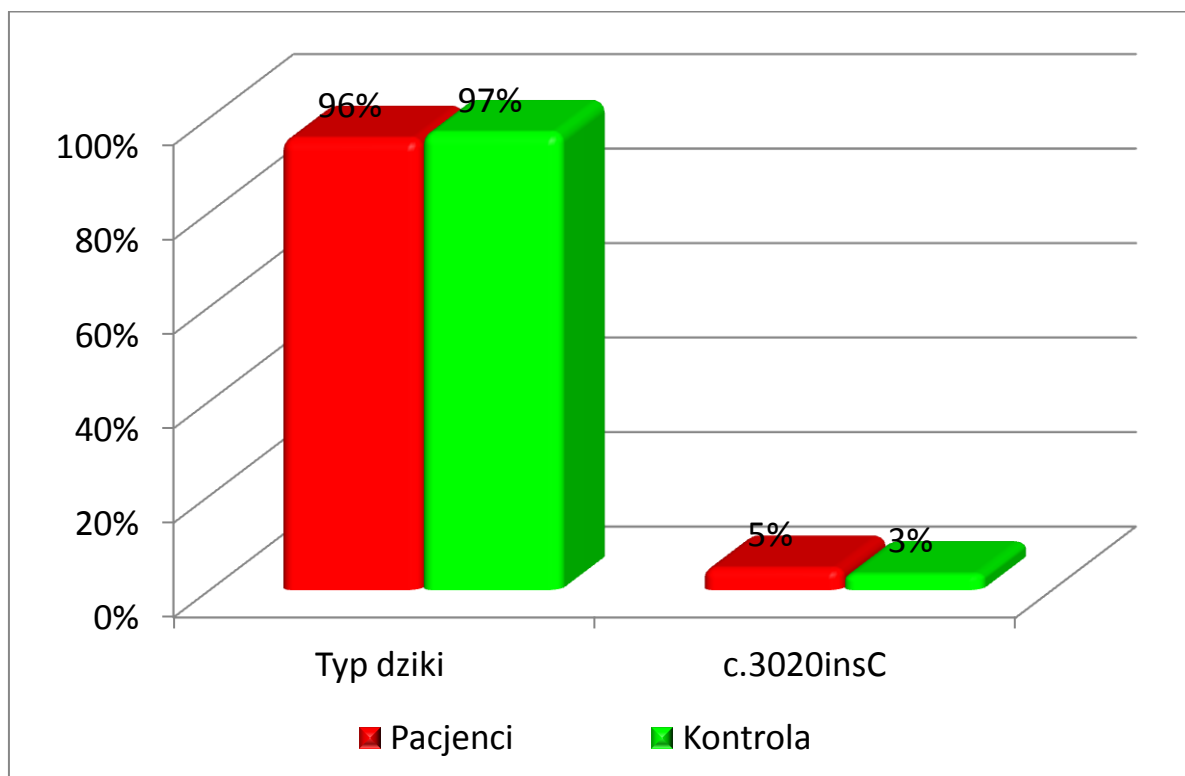
Fragment genu *NOD2* amplifikowano metodą PCR. Produkty reakcji denaturowano w 99°C przez 10 minut. Następnie schłodzono na lodzie i rozdzielono w 10% żelu poliakrylamidowym z 5% dodatkiem glicerolu. DNA wizualizowano przez srebrzenie. Tory 2, 6, 7, 8, 9, warianty bez insercji. Tory 3, 4, 5 heterozygoty insercji c.3020insC. Tor 1 homozygota insercji c.3020insC.



Ryc.14. Częstości genotypów c.3020insC w badanych grupach



Ryc.15. Częstość występowania insercji C.3020insC w badanych grupach



### 3.1.2. Badanie częstości substytucji c.802C>T

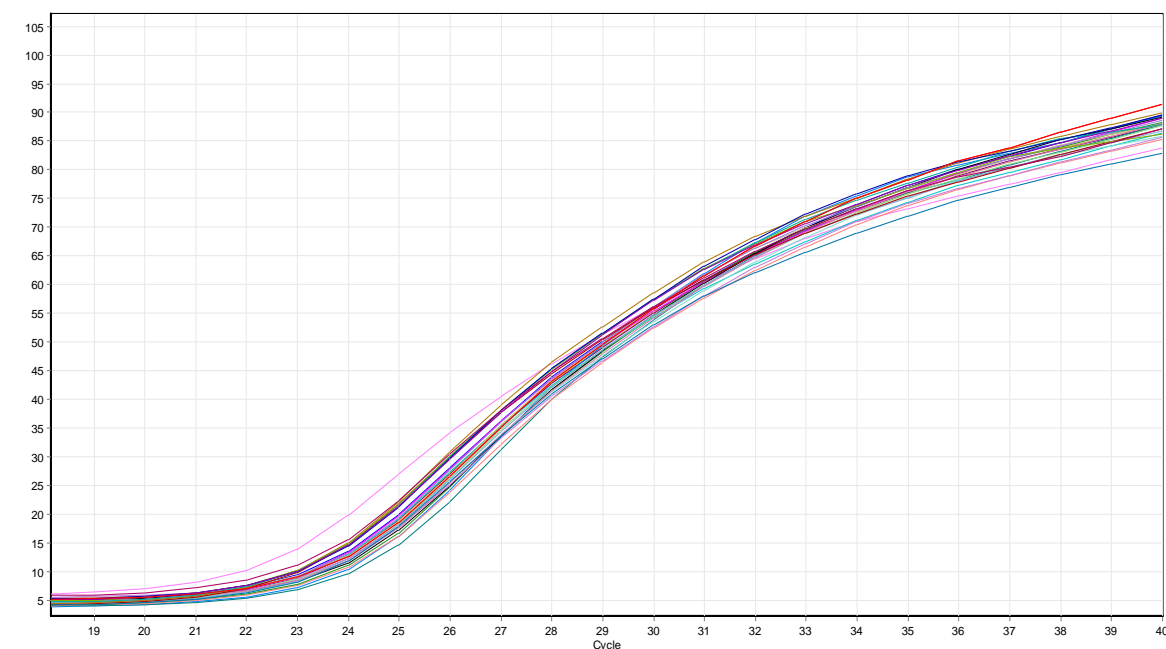
Badanie częstości c.802C>T w genie *NOD2* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.802C>T został zamplifikowany w reakcji PCR (Ryc.16). Następnie amplifikowany produkt PCR został stopiony w gradiencie temperatury, w wyniku czego otrzymano profile topnienia dla poszczególnych próbek.

W przypadku analizy c.802C>T, również jak w przypadku c.3020insC, już na podstawie profili topnienia można wskazać odmienne genotypy (Ryc.17). W dalszej części analizy program konwertuje krzywe profili topnienia na wykresy szybkości topnienia (Ryc.18), co po wyprowadzeniu pochodnych i przydzieleniu odpowiednich genotypów dla próbek o znanych genotypach umożliwia różnicowanie poszczególnych krzywych względem próby wzorcowej (Ryc.19). W części przypadków identyfikację alleli c.802C>T przeprowadzono na podstawie analizy restrykcyjnej, fragment DNA zawierający c.802C>T hydrolizowano enzymem restrykcyjnym BamH1. Wariant c.802C>T powoduje powstanie sekwencji rozpoznawanej przez ten enzym. Po hydrolizie obserwowano poszczególne genotypy, jak na rycinie 20.

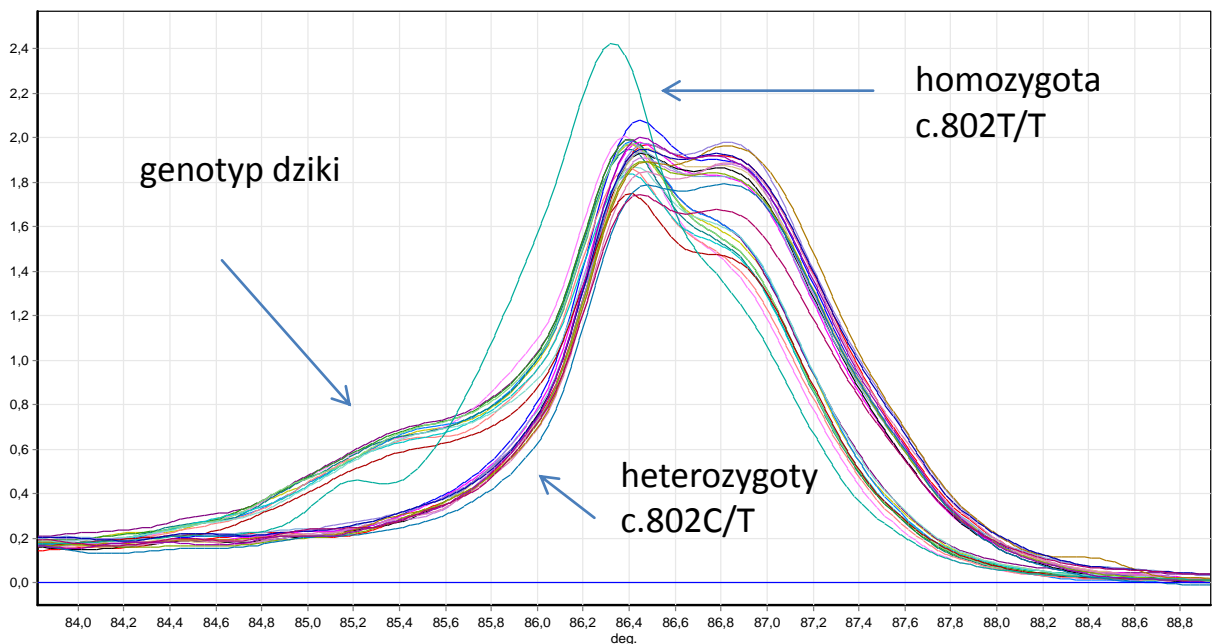
W przypadku c.802C>T częstości alleli w badanym locus w badanych grupach się różnią. Częstość allela T jest w grupie kontrolnej wyższa o 11% w porównaniu z grupą pacjentów (Ryc.21). Po przeanalizowaniu częstości genotypów i alleli w obu grupach i podziałem grupy pacjentów wg wskazań do

operacji zróżnicowanie to jest jeszcze wyższe (Ryc.22, 23, Tab.19 i 20). Częstości alleli w tym locus dla grupy badanej i grupy kontrolnej różnią się statystycznie istotnie w teście Chi-kwadrat przy  $p < 0,0001$ . Również częstości alleli c.802C>T różnią się statystycznie istotnie między grupą pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych i pozostałymi w teście dokładnym Fishera przy  $p = 0,0006$ . Częstości genotypów w tym locus również różnią się statycznie istotnie w grupie pacjentów i grupie kontrolnej w teście Chi-kwadrat przy  $p = 0,0026$ . Nie obserwuje się statystycznie istotnej różnicy w częstościach genotypów między grupami pacjentów podzielonych według wskazań do zabiegu operacyjnego.

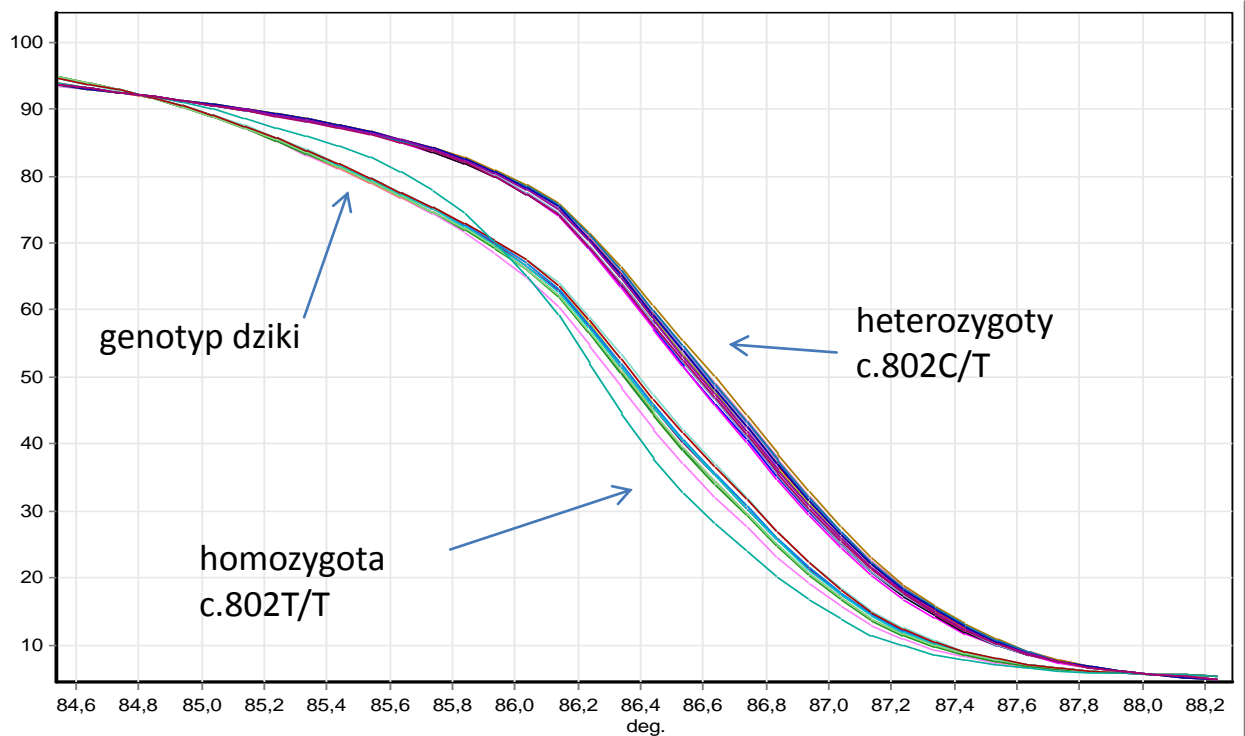
Ryc.16. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.802C>T w badanej grupie pacjentów



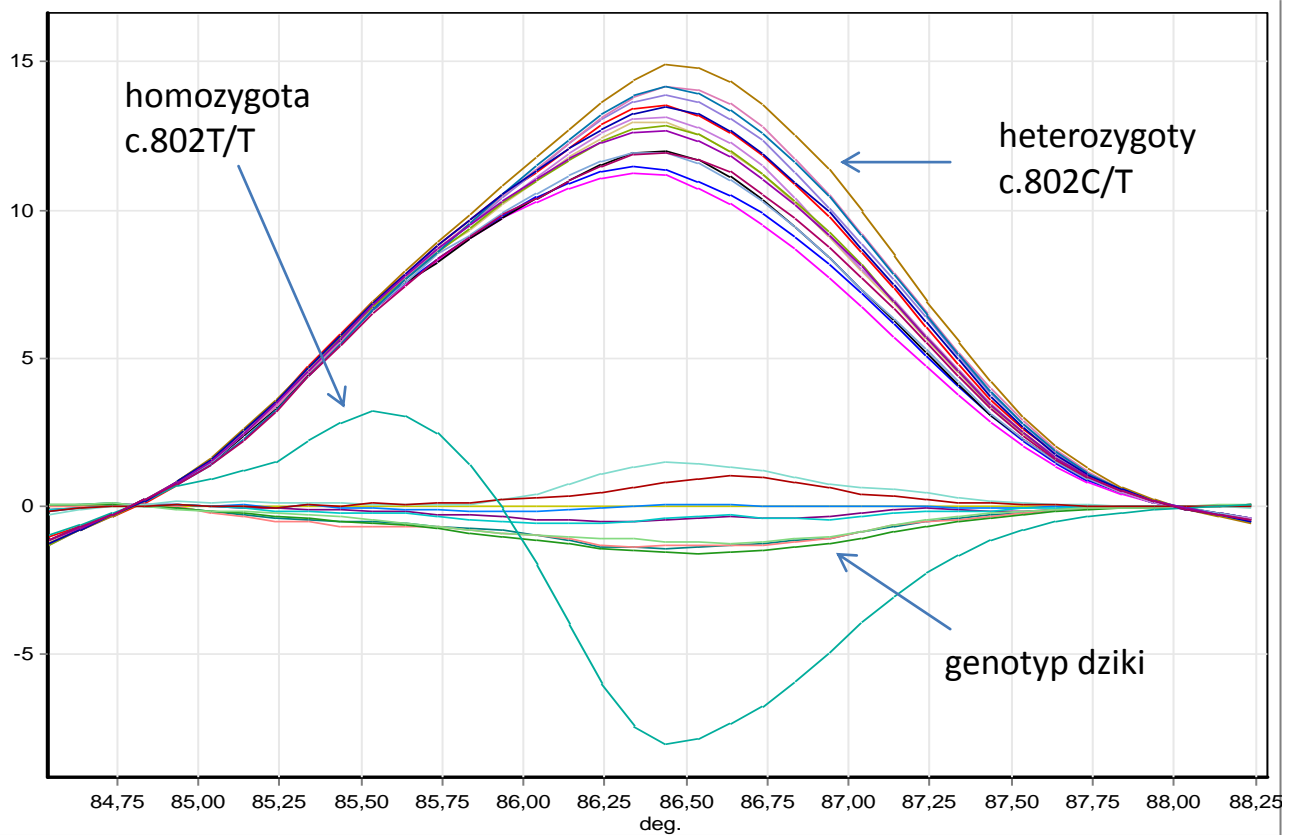
Ryc.17. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T w badanej grupie pacjentów



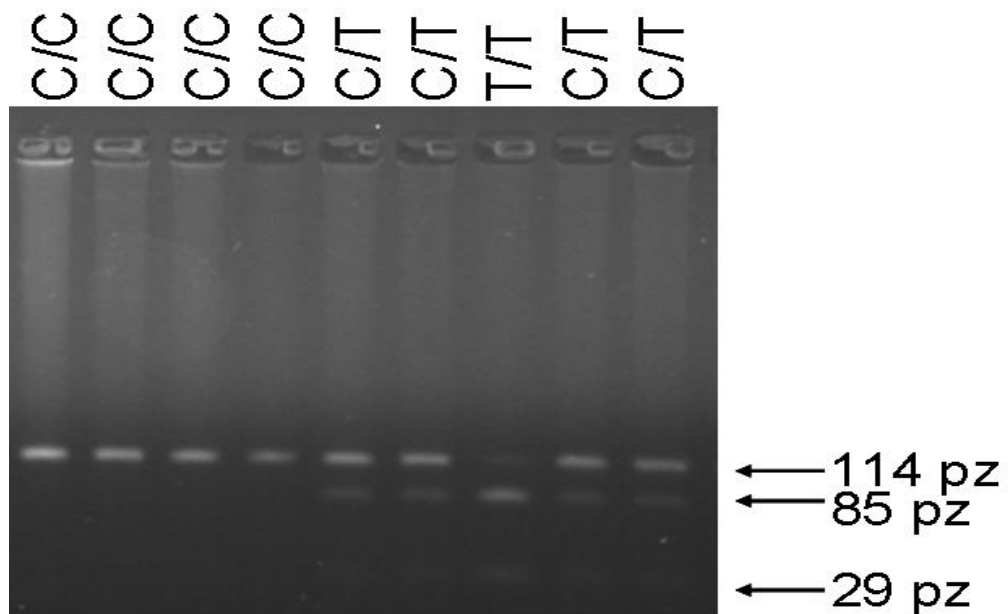
Ryc.18. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T w badanej grupie pacjentów



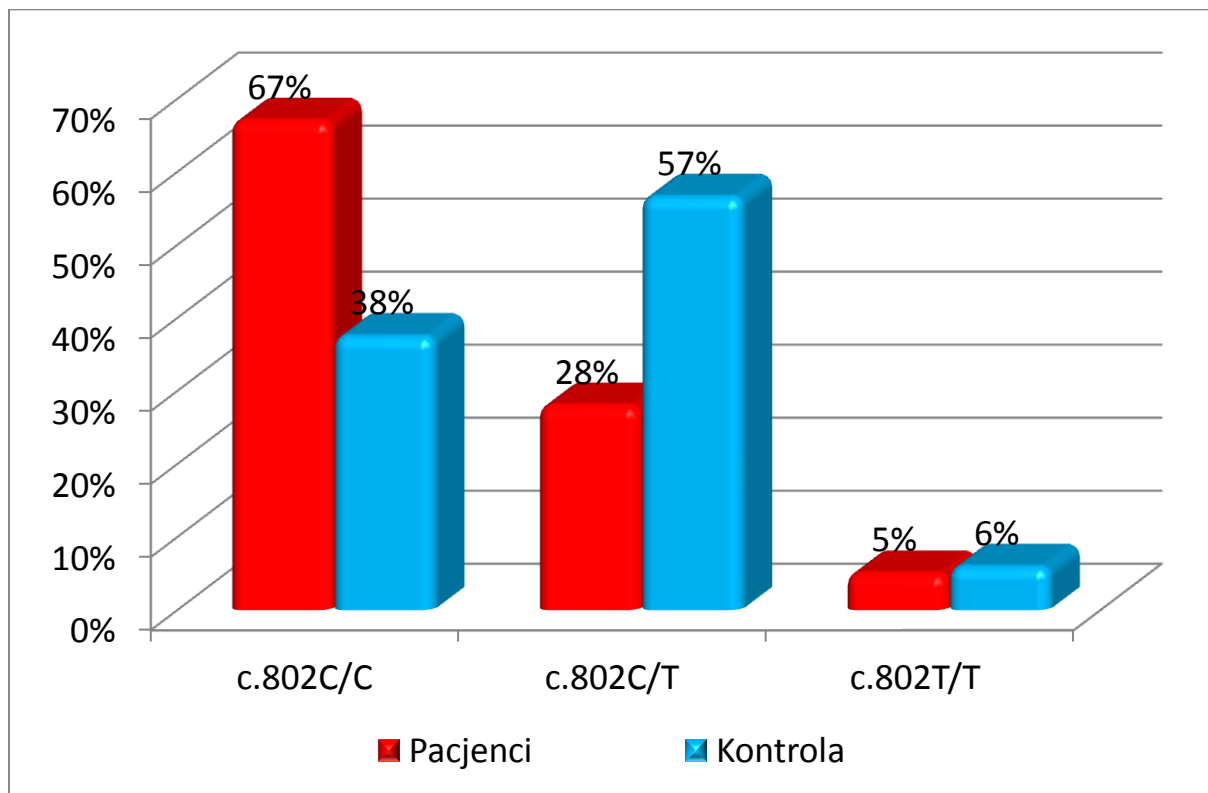
Ryc.19. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T



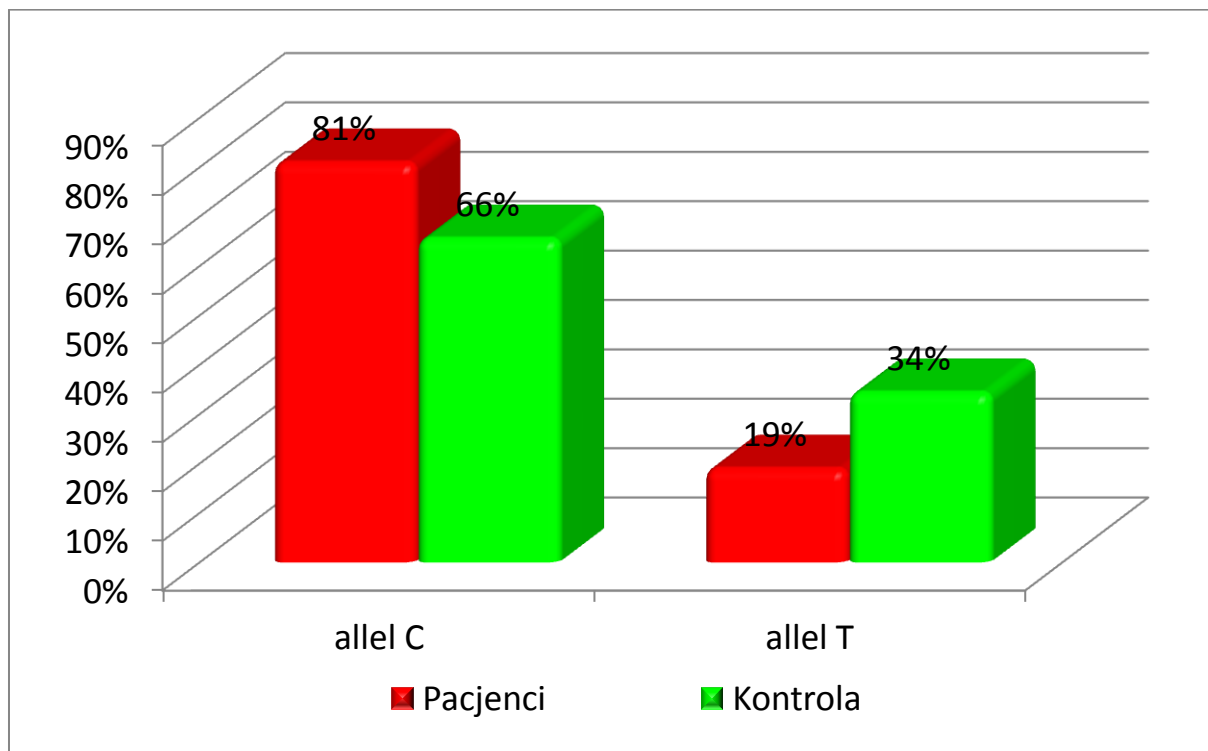
Ryc.20. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.802C>T w genie *NOD2*. Produkt PCR hydrolizowano enzymem restrykcyjnym BamH1 i rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym. Genotypy przedstawiono w górnej części żelu



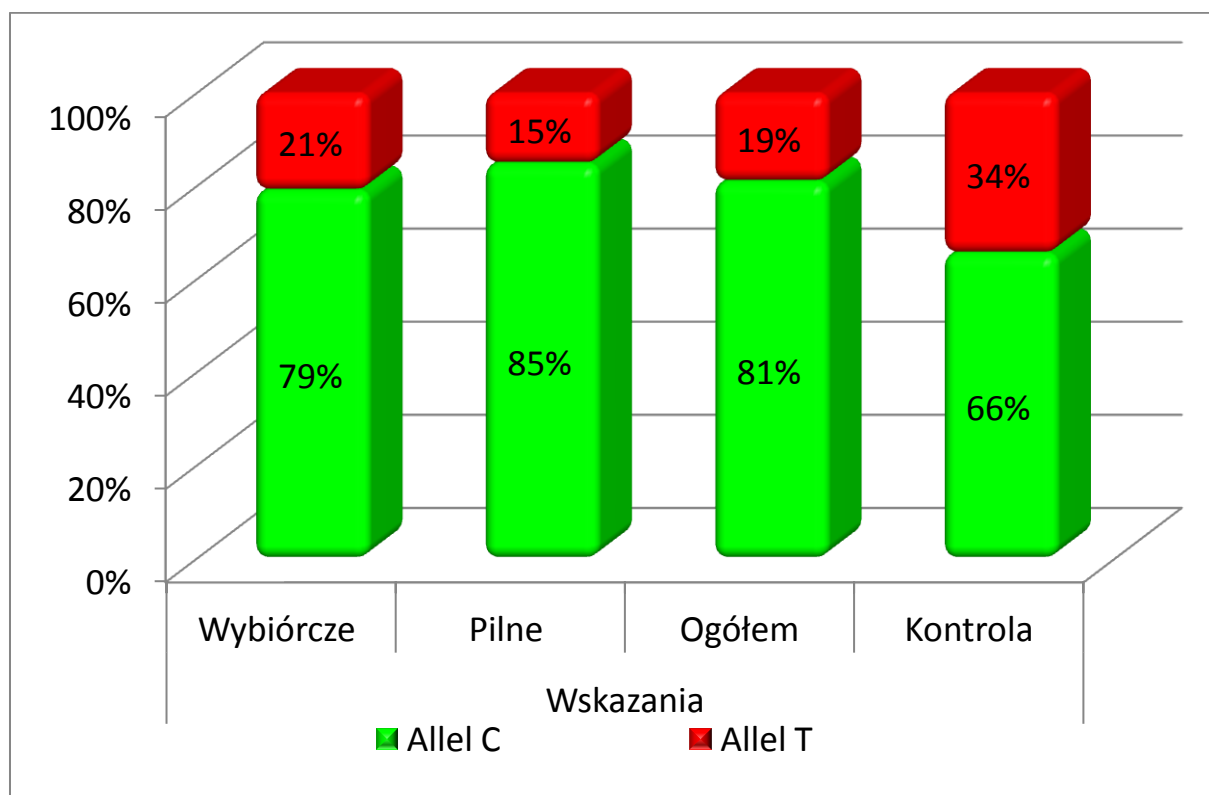
Ryc.21. Częstości genotypów polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc.22. Częstości alleli polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc.23. Częstości alleli polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w badanej grupie, z uwzględnieniem wskazań do operacji





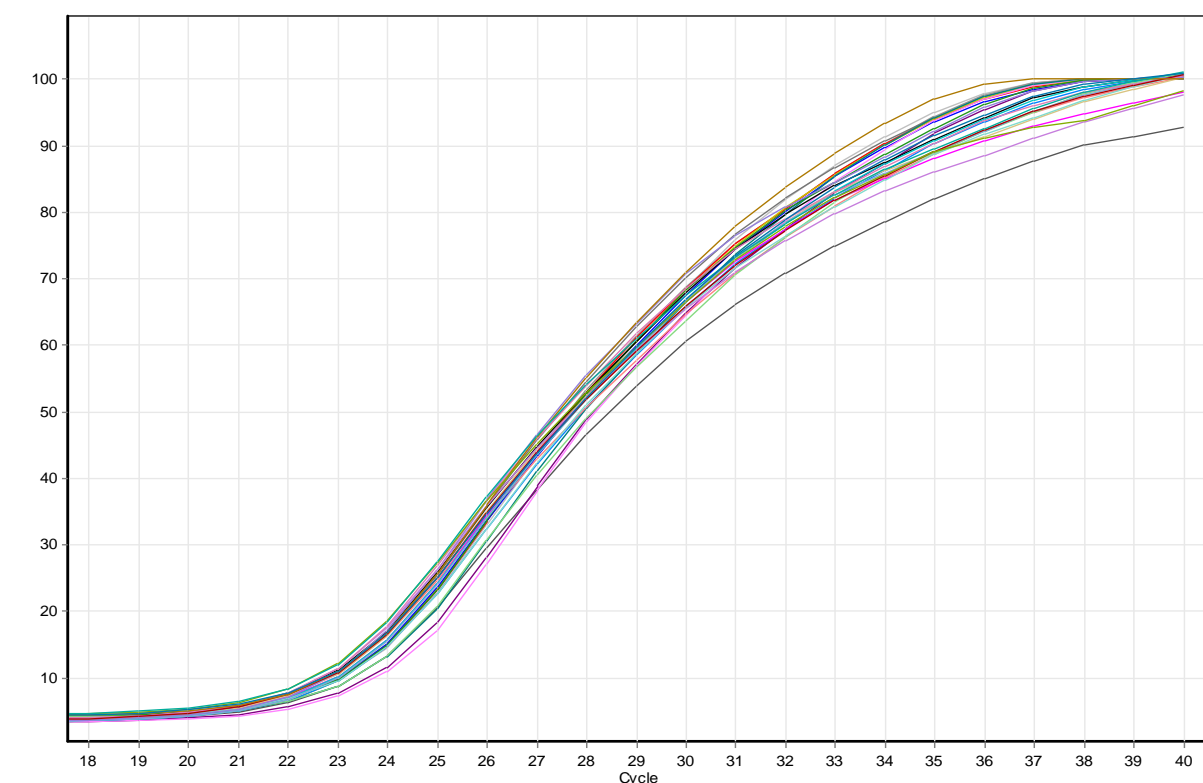
### 3.1.3. Badanie częstości substytucji c.2722G>C

Badanie częstości występowania c.2722G>C w genie *NOD2* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.2722G>C został amplifikowany w reakcji PCR (Ryc.24). Następnie amplifikowany produkt PCR został stopiony w gradiencie temperatury, w wyniku czego otrzymano profile topnienia dla poszczególnych próbek.

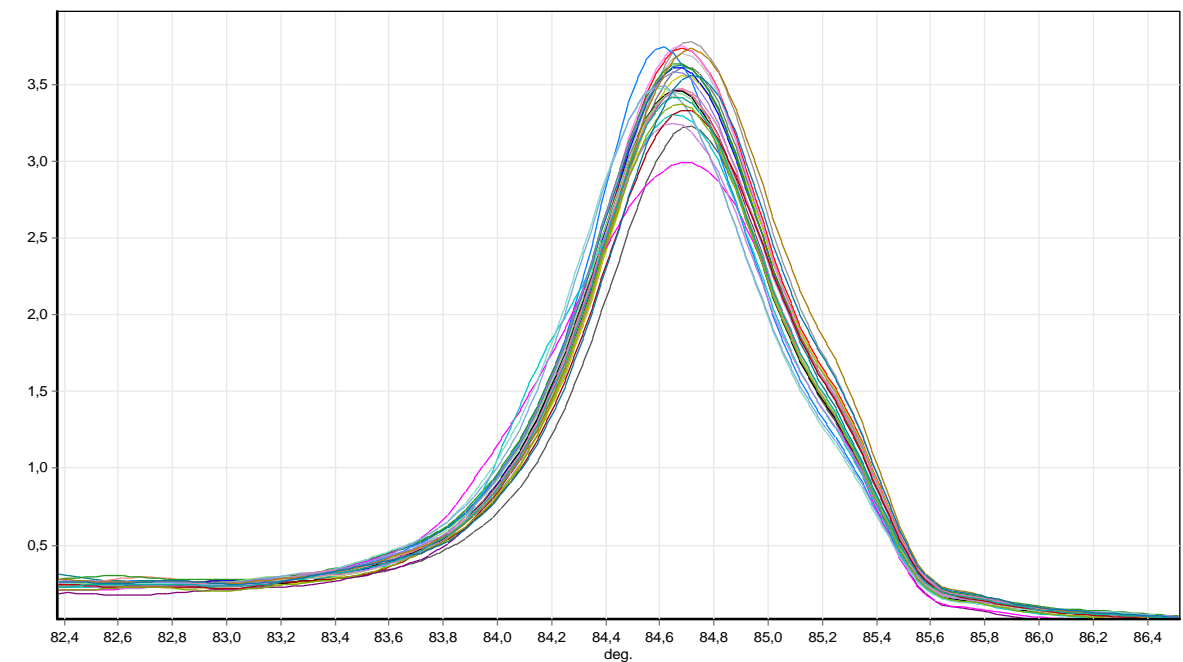
W przypadku analizy c.2722G>C na podstawie profili topnienia można wskazać genotypy (Ryc.25). Badanie substytucji C/G lub A/T może w niektórych przypadkach utrudniać analizę. Jednak dalsza obróbka wyników przez program, który konwertuje krzywe profili topnienia na wykresy szybkości topnienia (Ryc.26), pozwala już na obserwacje specyficznych krzywych, a dalsze różnicowanie krzywych pozwala na jednoznaczne określenie genotypów (Ryc.27).

Częstości alleli w badanym locus w badanych grupach się nie różnią (Ryc.29; Tab.20). W grupie pacjentów nie obserwowano homozygoty nosiciela mutacji. Heterozygot wariantu c.2722G>C obserwowano w grupie chorych o 4% więcej niż w grupie kontrolnej, jednak liczba alleli C była wyższa w grupie pacjentów o 1%. W przypadku c.2722G>C nie zaobserwowano różnic w częstościach występowania poszczególnych genotypów i alleli w obu podgrupach pacjentów i żadne ze wskazanych nieznaczących różnic w częstościach nie były statystycznie istotne (Tab.19 i 20).

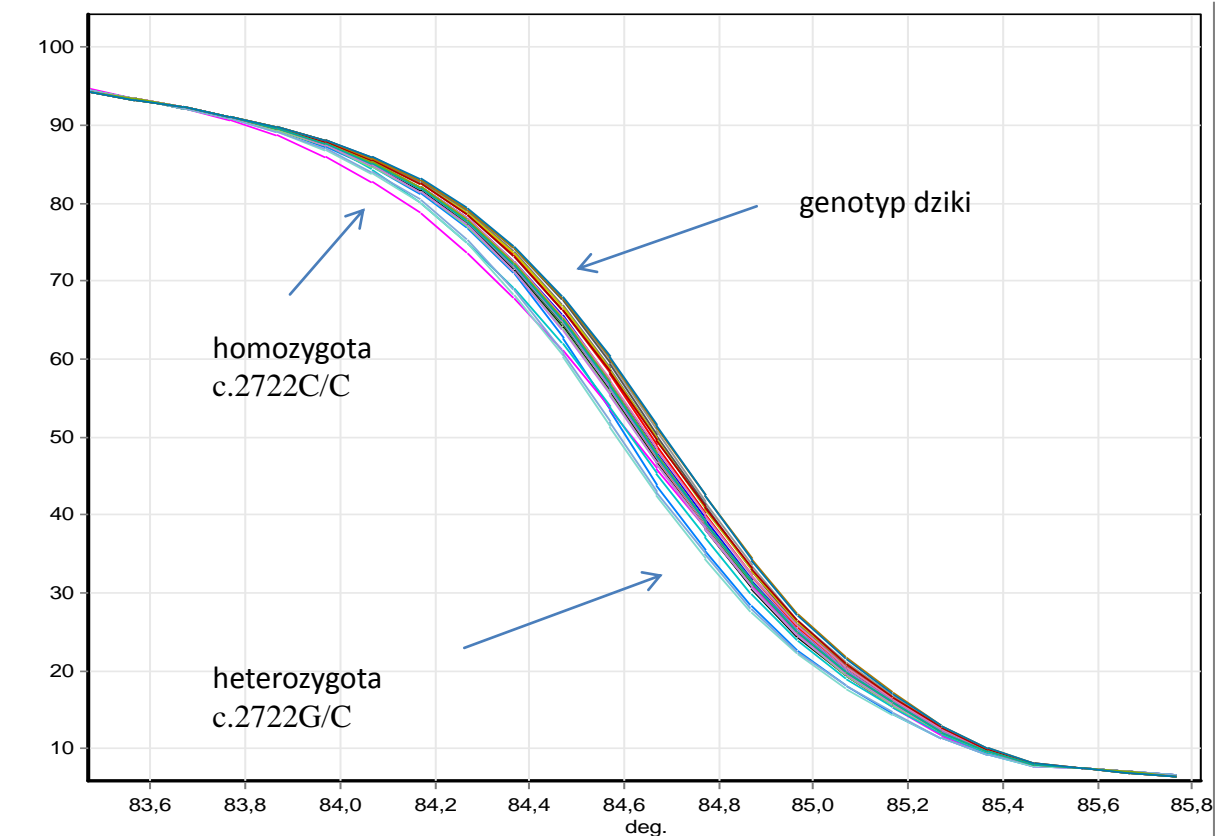
Ryc.24. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* obejmującego c.2722G>C w badanej grupie chorych



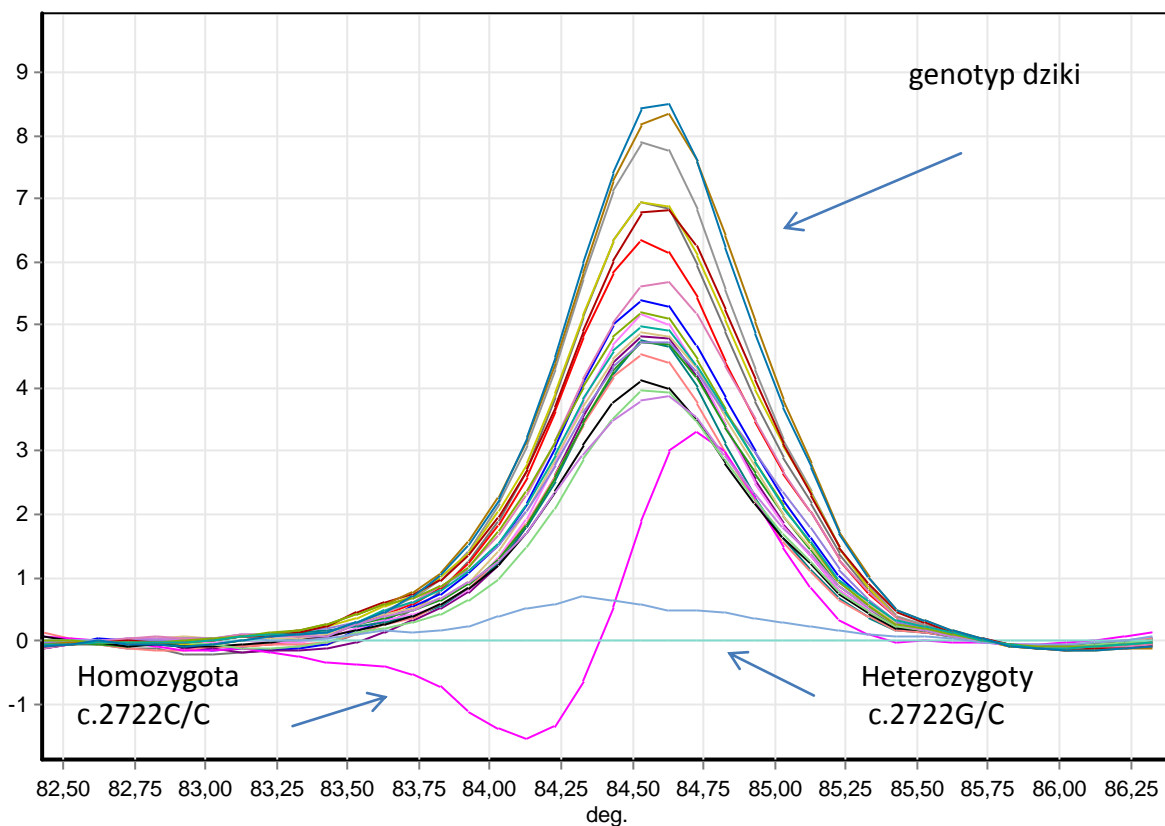
Ryc.25. Profile topnienia w badanej grupie pacjentów fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych. W przypadku tego wariantu rozróżnienie poszczególnych wariantów nie jest możliwe na tym etapie badania



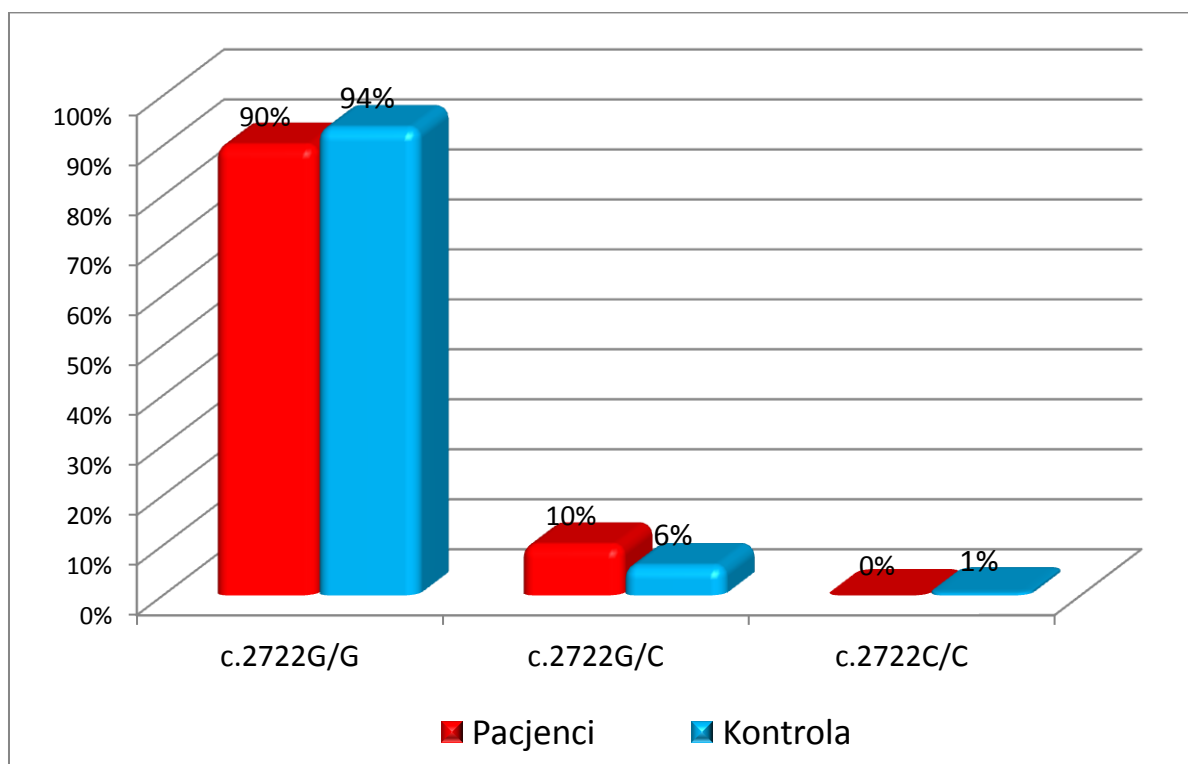
Ryc.26. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych



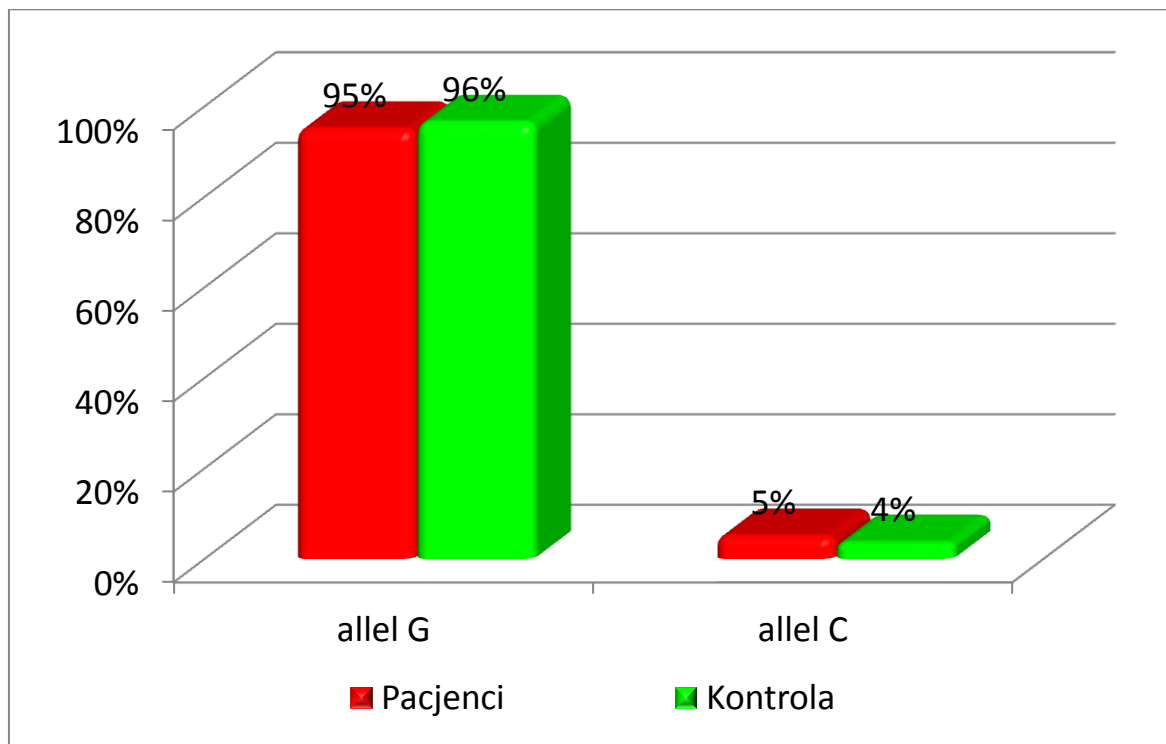
Ryc.27. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych



Ryc.28. Zestawienie częstości genotypów c.2722G>C w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc. 29. Częstości alleli w c.2722G>C obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



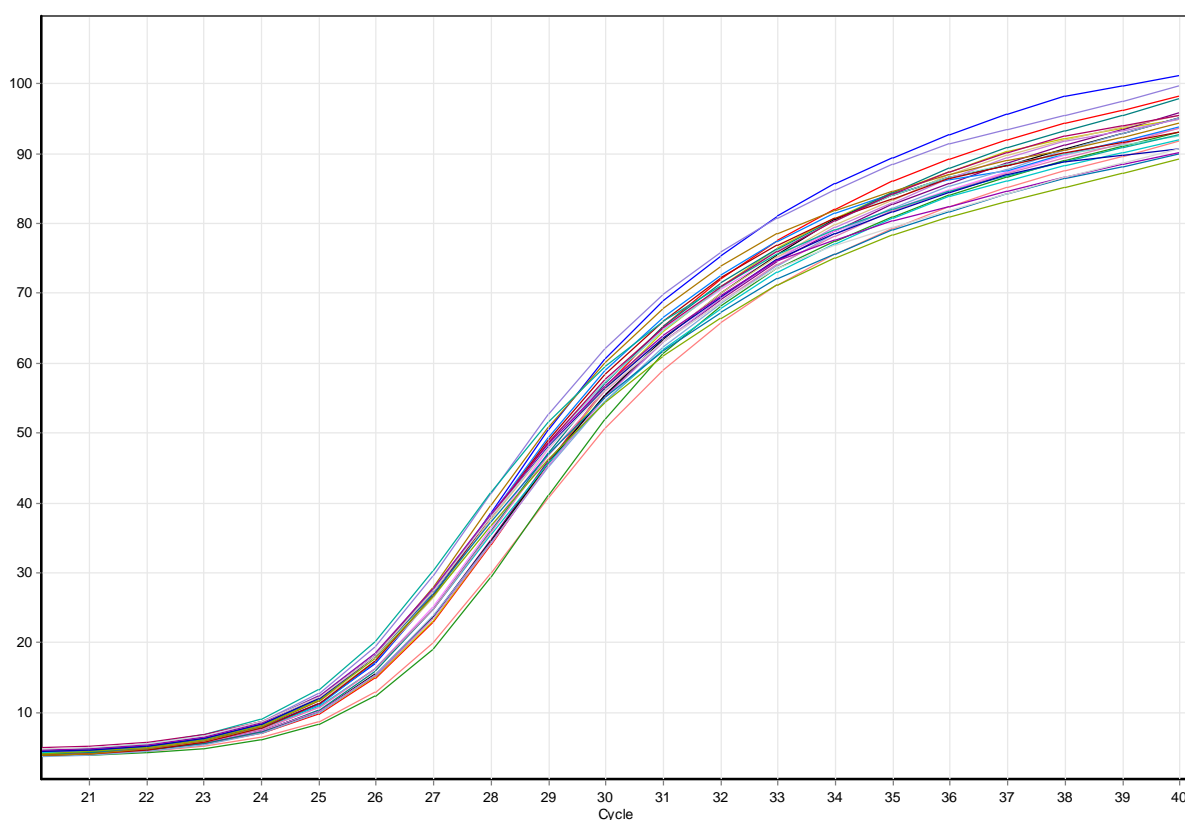
### 3.1.4. Badanie częstości substytucji c.2104C>T

Badanie częstości występowania c.2104C>T w genie *NOD2* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.2104C>T został amplifikowany w reakcji PCR. Przyrost produktów reakcji mierzony w czasie rzeczywistym przedstawiono na rycinie 30. Następnie amplifikowany produkt PCR został stopiony w gradiencie temperatury, w wyniku czego otrzymano profile topnienia dla poszczególnych próbek.

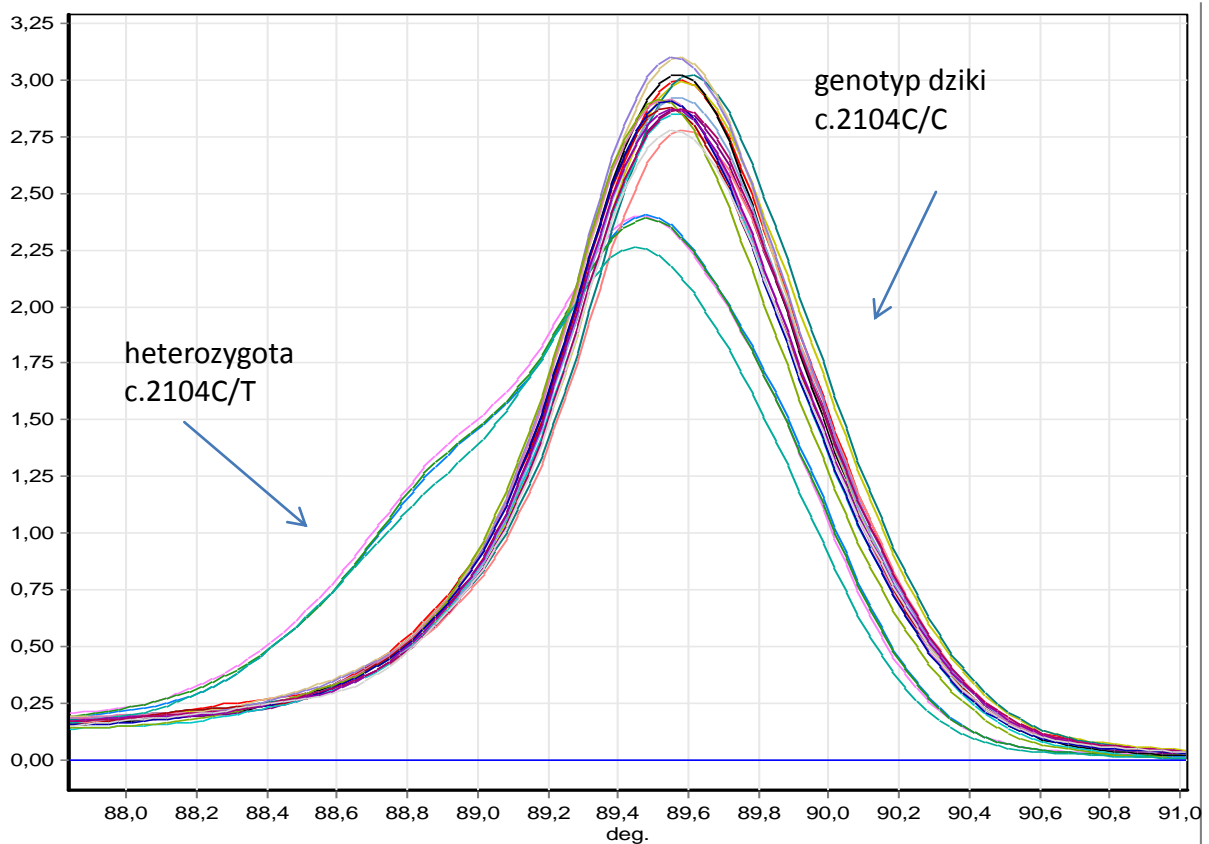
W tym locus nie obserwowano homozygoty nosiciela mutacji, jednak już na podstawie profili topnienia można bardzo jednoznacznie odróżnić występowanie wariantu c.2104C>T w układzie heterozygotycznym (Ryc.31). W dalszej części analiza dotyczy szybkości topnienia (Ryc.32), a po wyprowadzeniu pochodnych określono poszczególne genotypy (Ryc.33).

W części przypadków przed zakupem aparatu do HRM identyfikację alleli c.2104C>T przeprowadzono na podstawie analizy restrykcyjnej – fragment DNA zawierający c.2104C>T hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *MspI*. Wariant c.2104C>T powoduje zanik sekwencji rozpoznawanej przez ten enzym. Obserwowane genotypy przedstawiono na rycinie 34. W przypadku c.2104C>T częstości alleli w badanym locus w badanych grupach różnią się nieznacznie i obserwowane różnice nie są istotne statystycznie (Ryc.35, 36, Tab.19 i 20).

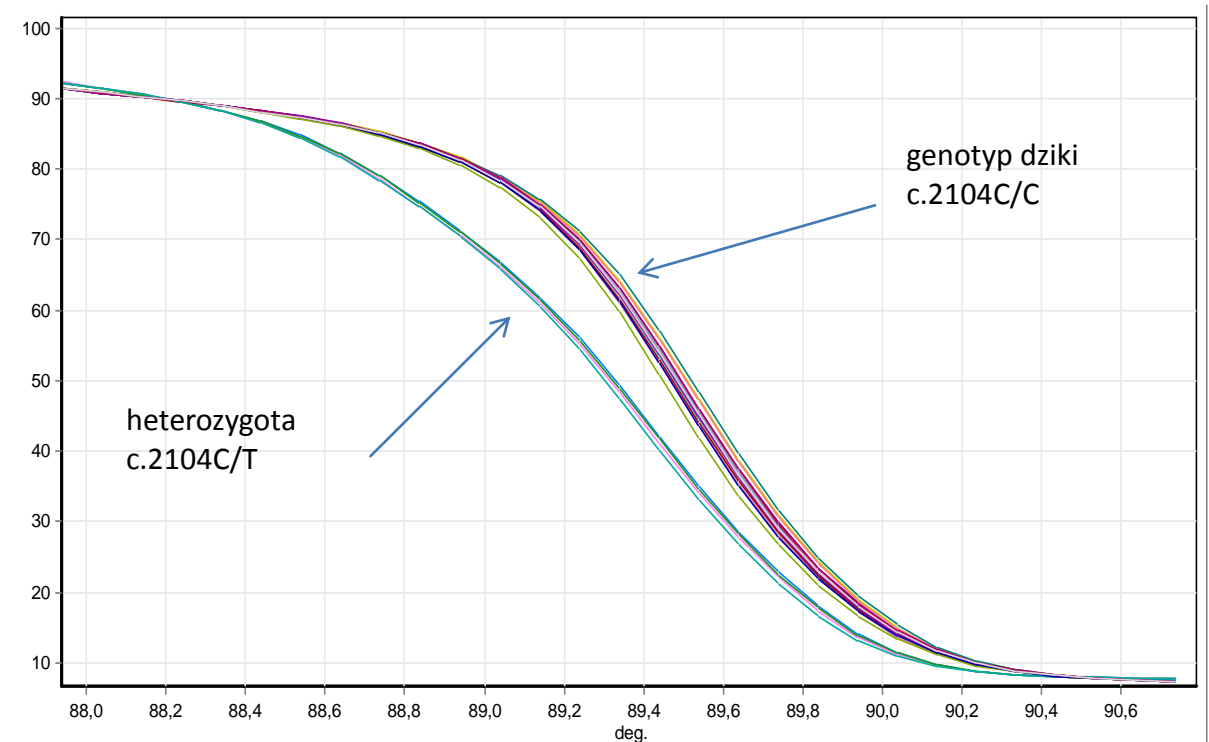
Ryc.30. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.2104C>T w badanej grupie chorych



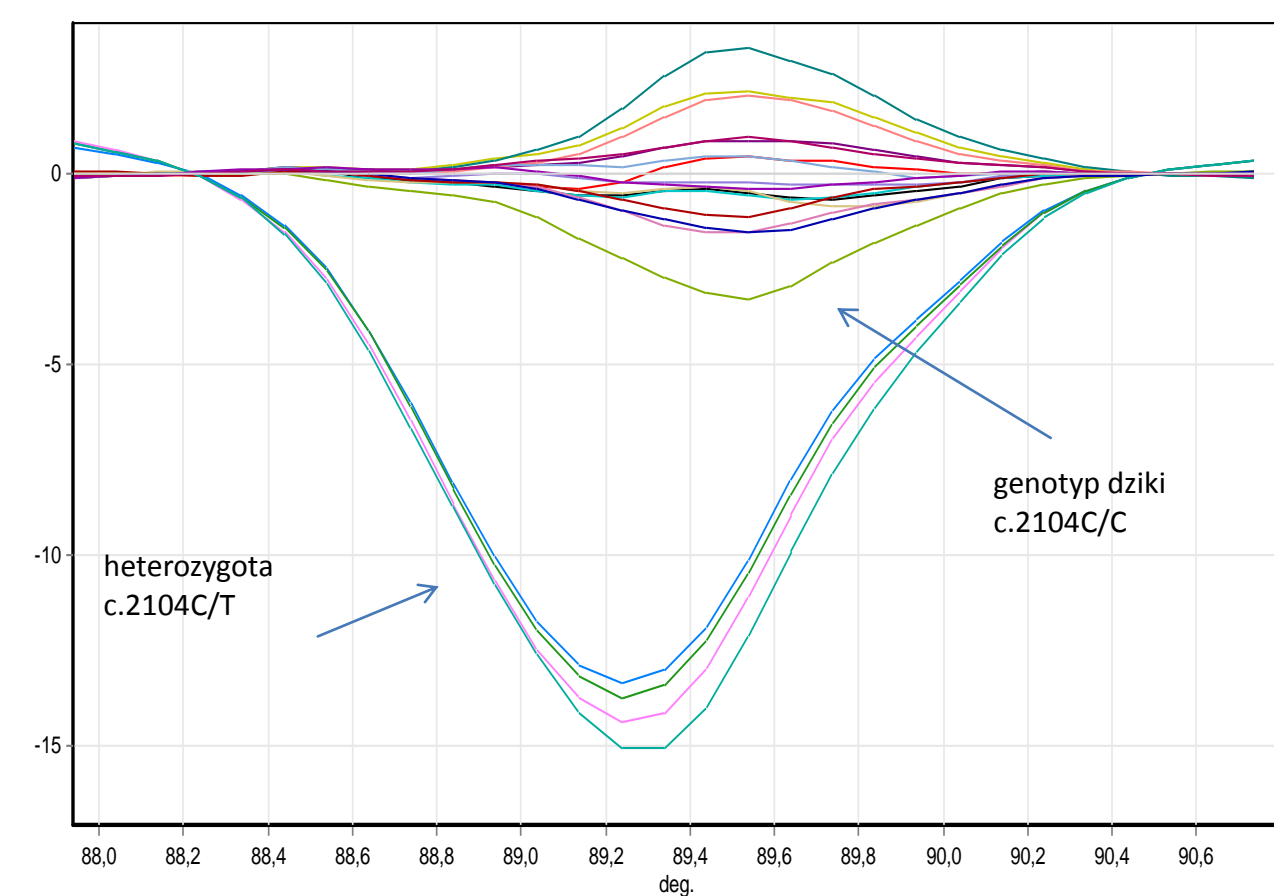
Ryc.31. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T w badanej grupie pacjentów



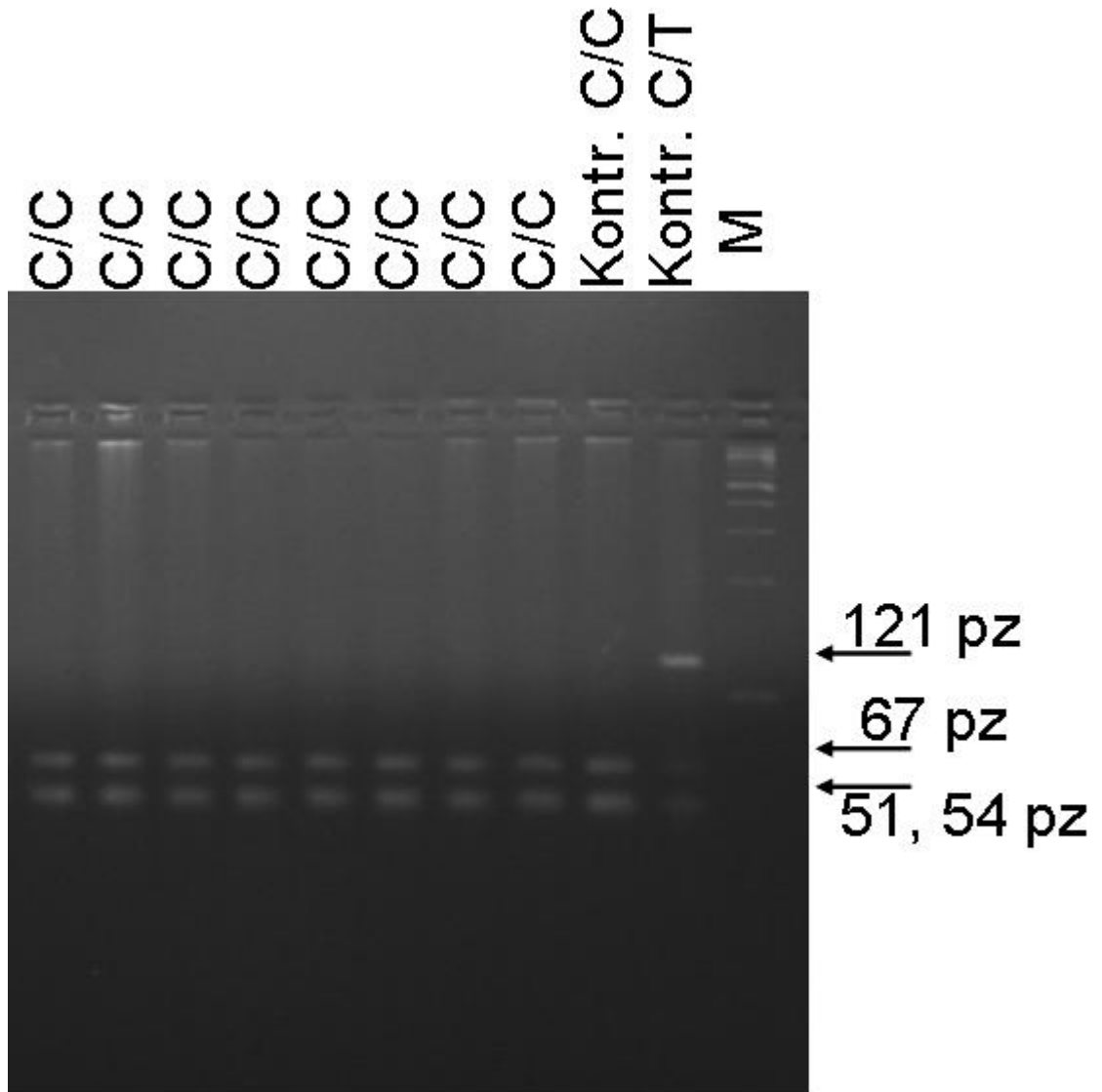
Ryc.32. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T w badanej grupie pacjentów



Ryc.33. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T

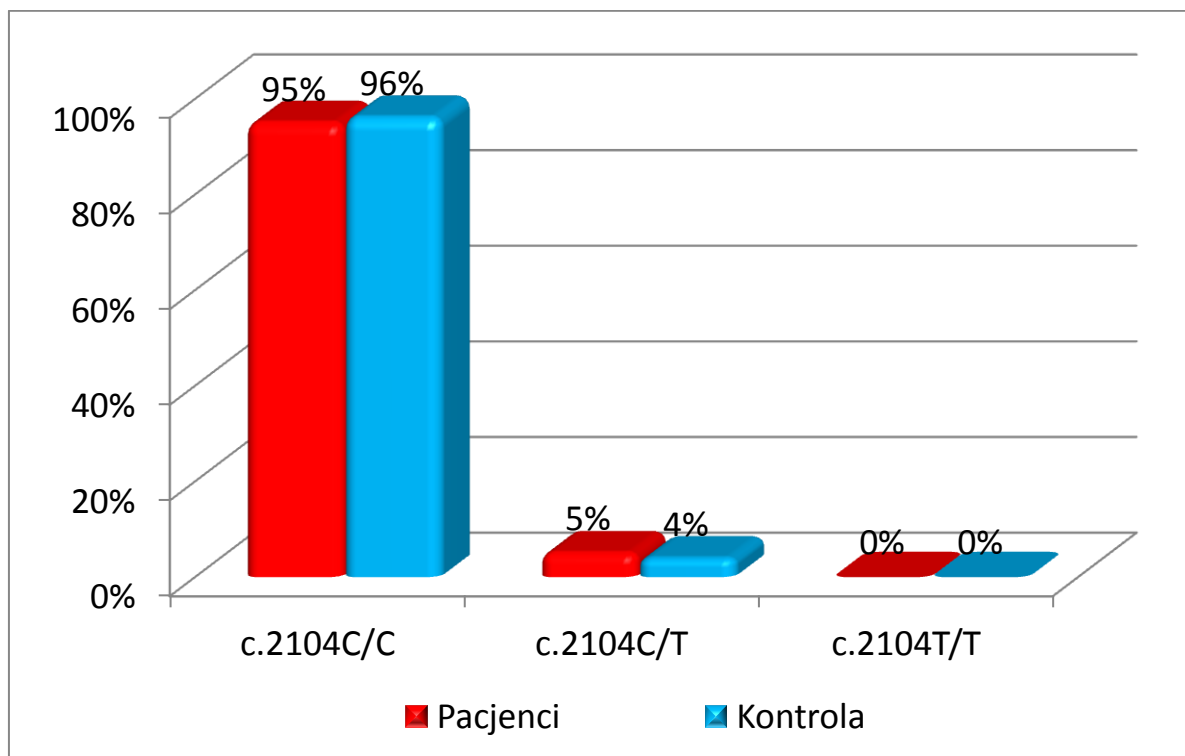


Ryc.34. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.2104C>T genu *NOD2* w grupie chorych. Genotypy podano w górnej części żelu. Kontrole pozytywne to tory oznaczone kontr. C/C oraz kontr. C/T, przygotowano tylko dla genotypów C/C i C/T, ponieważ w badaniach naszej populacji nie obserwowano genotypu T/T. Linia M – marker wielkości

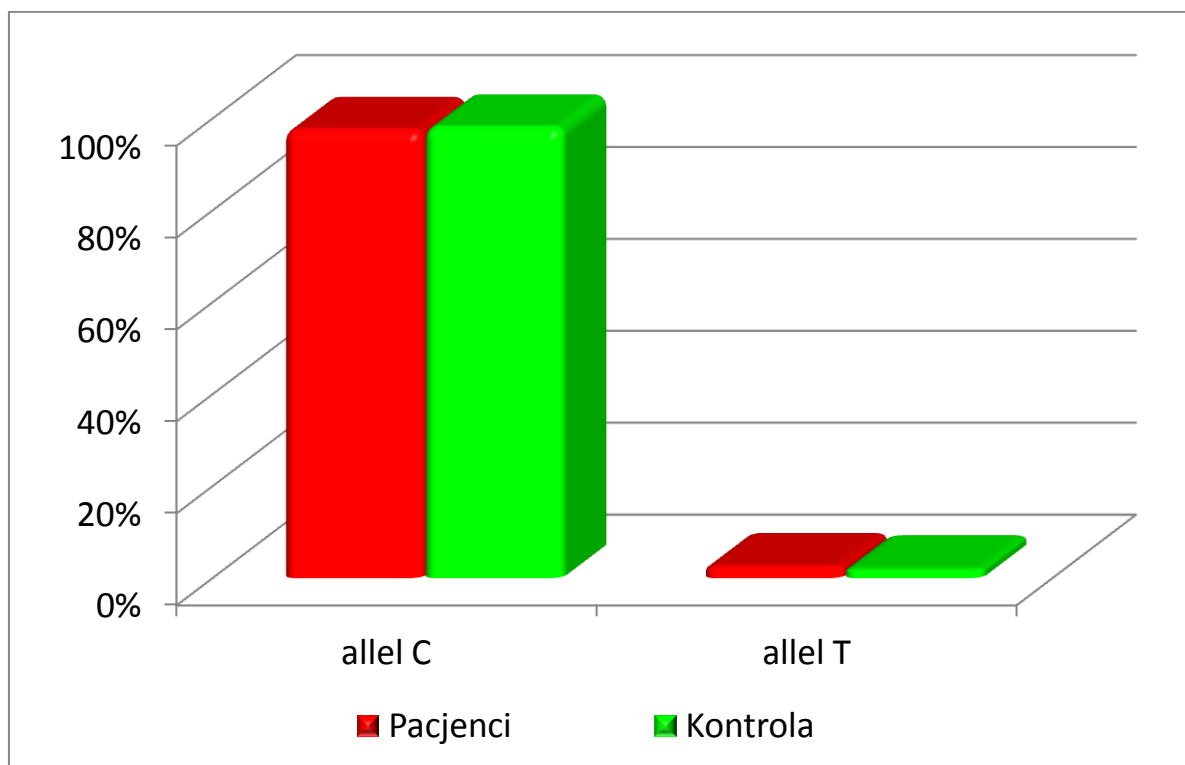




Ryc.35. Częstości genotypów c.2104C>T genu *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc.36. Zestawienie częstości alleli wariantu c.2104C>T genu *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Tab.19. Częstości genotypów obserwowanych w genie *NOD2*

	Homozygota typu dzikiego	Heterozygoty	Homozygota wariantu	Liczba badanych osób
Badany wariant	c.3020insC			
Genotyp	Typ dziki	c.2030insC heterozygota	c.2030insC homozygota	
Wskazanie wybiórcze	61(91%)	5(7,5%)	1(1,5%)	67
Wskazanie pilne	31(94%)	2(6%)	0 (0%)	33
Pacjenci ogółem	92 (92%)	7 (7%)	1 (1%)	100
Kontrola	145 (94,2%)	8 (5,2%)	1 (0,6%)	154
Badany wariant	c.802C>T			
Genotyp	c.802C/C	c.802C/T	c.802T/T	
Wskazanie wybiórcze *	44 (65,7%)	18 (26,9%)	5 (7,5%)	67
Wskazanie pilne *	23 (69,7%)	10 (30,3%)	0 (0%)	33
Pacjenci ogółem *	67 (67%)	28 (28%)	5 (5%)	100
Kontrola	58 (38%)	86 (56%)	10 (6%)	154
Badany wariant	c.2722G>C			
Genotyp	c.2722G/G	c.2722G/C	c.2722C/C	Razem
Wskazanie wybiórcze	61 (91%)	6 (9%)	0 (0%)	67
Wskazanie pilne	29 (88%)	4 (12%)	0 (0%)	33
Pacjenci ogółem	90 (90%)	10 (10%)	0 (0%)	100
Kontrola	144 (97%)	9 (6%)	1 (1%)	154
Badany wariant	Gen <i>NOD2</i> c.2104C>T			
Genotyp	c.2104C/C	c.2104C/T	c.2104T/T	Razem
Wskazanie wybiórcze	64 (95,5%)	3 (4,5%)	0 (0%)	67
Wskazanie pilne	31 (94%)	2 (6%)	0 (0%)	33
Pacjenci ogółem	95(%)	5 (5%)	0%	100
Kontrola	148 (96%)	6 (4%)	0 (0%)	154

\* rozkład częstości genotypów statystycznie istotnie różny w porównaniu z grupą kontrolną w teście Chi-kwadrat

Tab.20. Częstości alleli obserwowanych w genie *NOD2*

	Allel polimorficzny	Allel dziki	Liczba badanych alleli
Badany wariant	Gen <i>NOD2</i> c.3020insC		
Allel	3020insC	Typ dziki	
Wskazanie wybiórcze	7 (5,2%)	127 (94,8%)	134
Wskazanie pilne	2 (2%)	64(97%)	66
Pozostali	9 (4,5%)	191 (95,5%)	200
Kontrola	10 (3%)	298 (97%)	288
Badany wariant	Gen <i>NOD2</i> c.802C>T		
Allel	T	C	
Wskazanie wybiórcze *	28 (21%)	106(79%)	134
Wskazanie pilne *	10 (15,2%)	56 (84,8%)	66
Pacjenci ogółem *	38 (19%)	162 (81%)	200
Kontrola	106 (34%)	202 (66%)	308
Badany wariant	c.2722G>C		
Allel	C	G	
Wskazanie wybiórcze	6 (4,5%)	128 (95,5%)	134
Wskazanie pilne	4 (6%)	62 (94%)	66
Pacjenci ogółem	10 (5%)	190 (95%)	200
Kontrola	11 (4%)	297 (96%)	308
Badany wariant	Gen <i>NOD2</i> c.2104C>T		
Allel	T	C	
Wskazanie wybiórcze	3 (2,2%)	131 (97,8%)	134
Wskazanie pilne	2 (3%)	64 (97%)	66
Pacjenci ogółem	5 (2,5%)	195 (97,5%)	100
Kontrola	6 (4%)	302 (96%)	308

\* częstość alleli statystycznie istotnie różna w porównaniu z grupa kontrolną w teście dokładnym Fishera

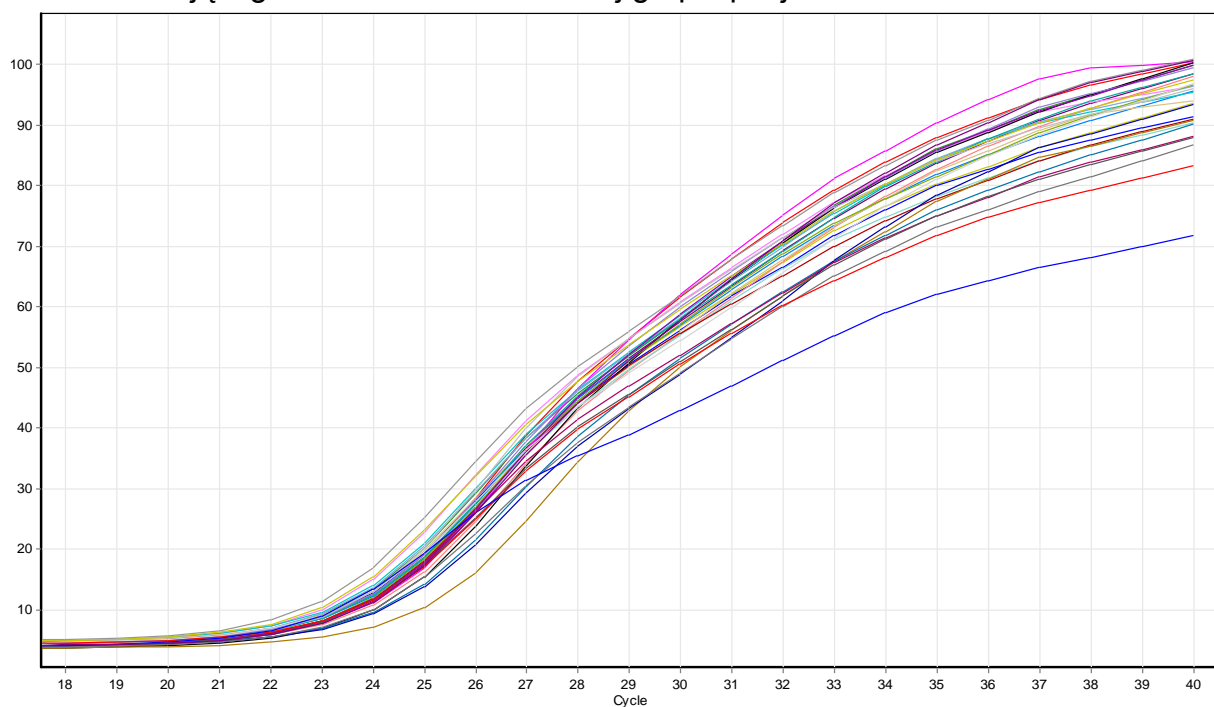
### 3.2. Geny *SLC22A5* i *SLC22A4*

#### 3.2.1. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.1-207G/C w genie *SLC22A5*

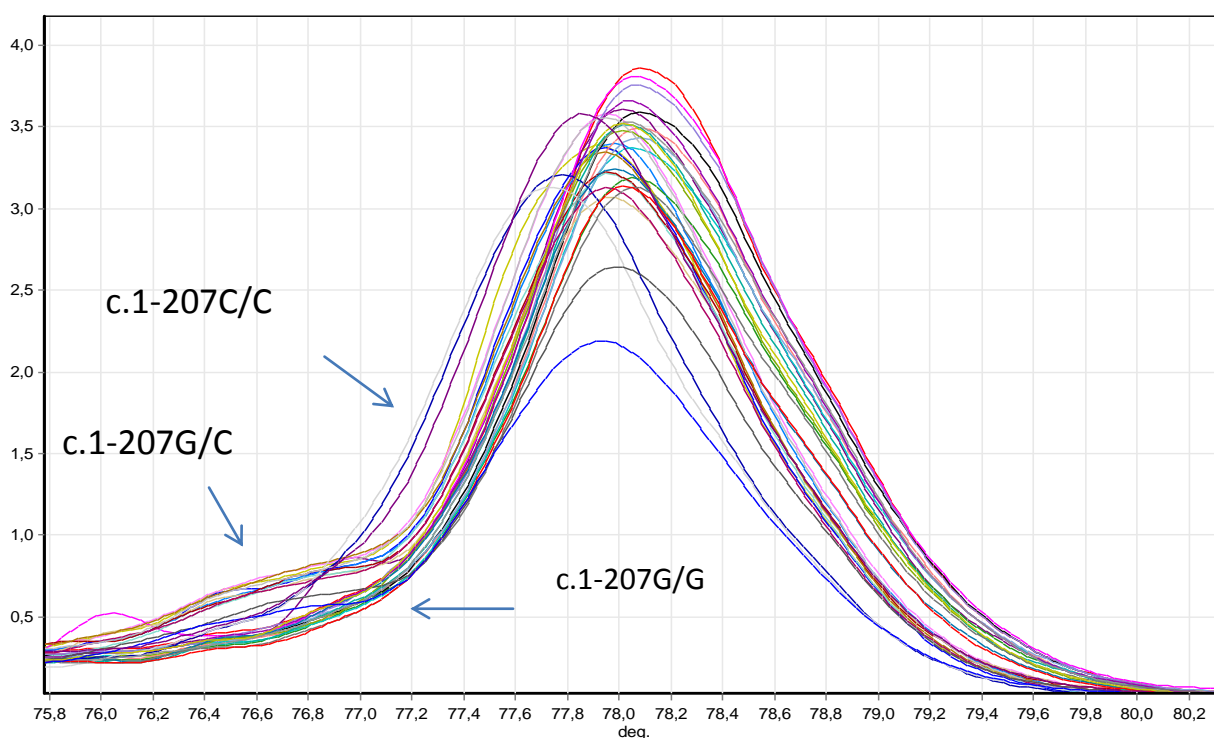
Badanie częstości występowania c.1-207G/C w genie *SLC22A5* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.1-207G/C został amplifikowany w reakcji PCR. Przyrost produktów reakcji mierzony w czasie rzeczywistym przedstawiono na rycinie 37. Na rycinie 38 przedstawiono profile topnienia badanego fragmentu. Następnie przeanalizowano szybkość topnienia (Ryc.39), a po wprowadzeniu pochodnych ustalono genotypy poszczególnych badanych próbek względem prób wzorcowych (Ryc.40).

Częstości zidentyfikowanych genotypów w poszczególnych grupach się różnią. Częstość genotypu CC jest w grupie pacjentów o ponad połowę wyższa niż w grupie kontrolnej (Ryc.41, Tab.21). Różnice te jednak nie są istotne statystycznie. Częstość allela C w grupie chorych to 47%, a w grupie kontrolnej 37% (Ryc.43, Tab.22). Różnica ta jest statystycznie znamienne przy  $p=0,033$ . W badanej grupie chorych obserwuje się zróżnicowanie w częstości genotypów, jak i alleli w grupach operowanych ze wskazań wybiórczych i pozostałych (Ryc.42, 44, Tab.21 i 22). W grupie operowanej ze wskazań pozostałych (pilnych i nagłych) obserwuje się podwyższoną częstość alleli związanych ze zwiększeniem ryzyka choroby. Częstość allela C w grupie pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych to 43%, a w grupie pozostałych pacjentów – 53%. Również genotyp CC występuje w grupie pacjentów operowanych ze wskazań pilnych i nagłych z częstością wyższą o 8%. Różnice te nie są statystycznie istotne.

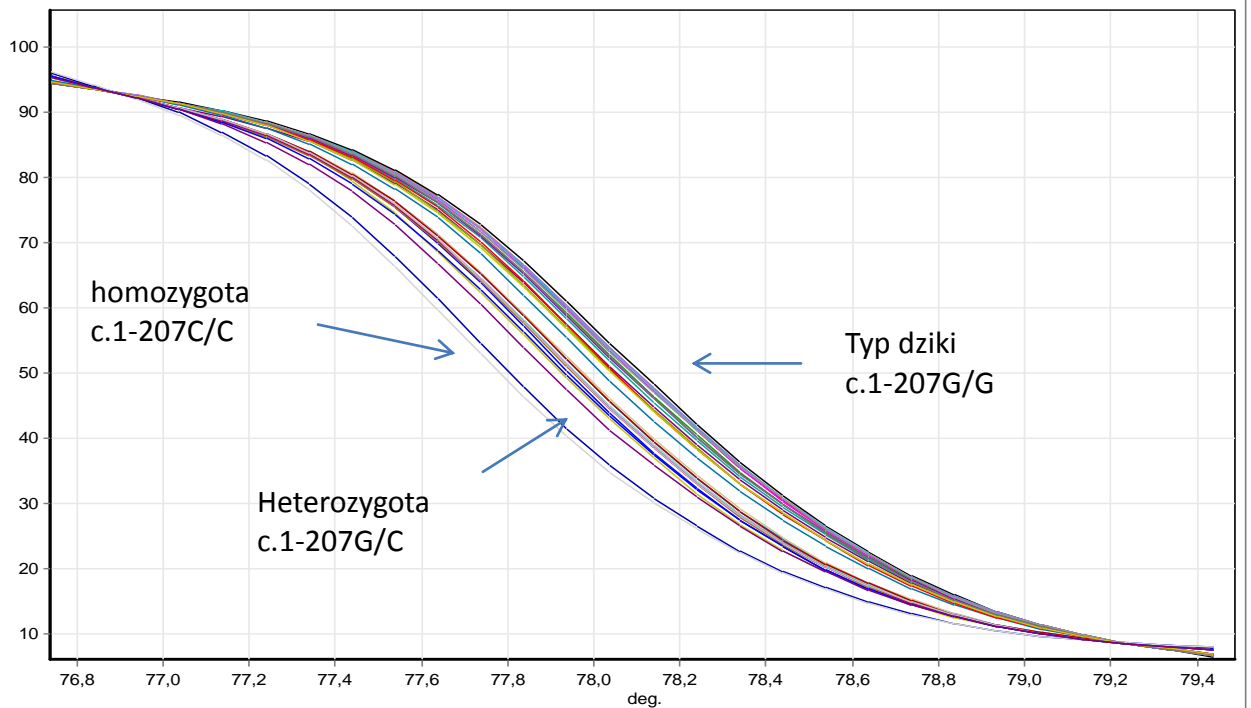
Ryc.37. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G>C w badanej grupie pacjentów



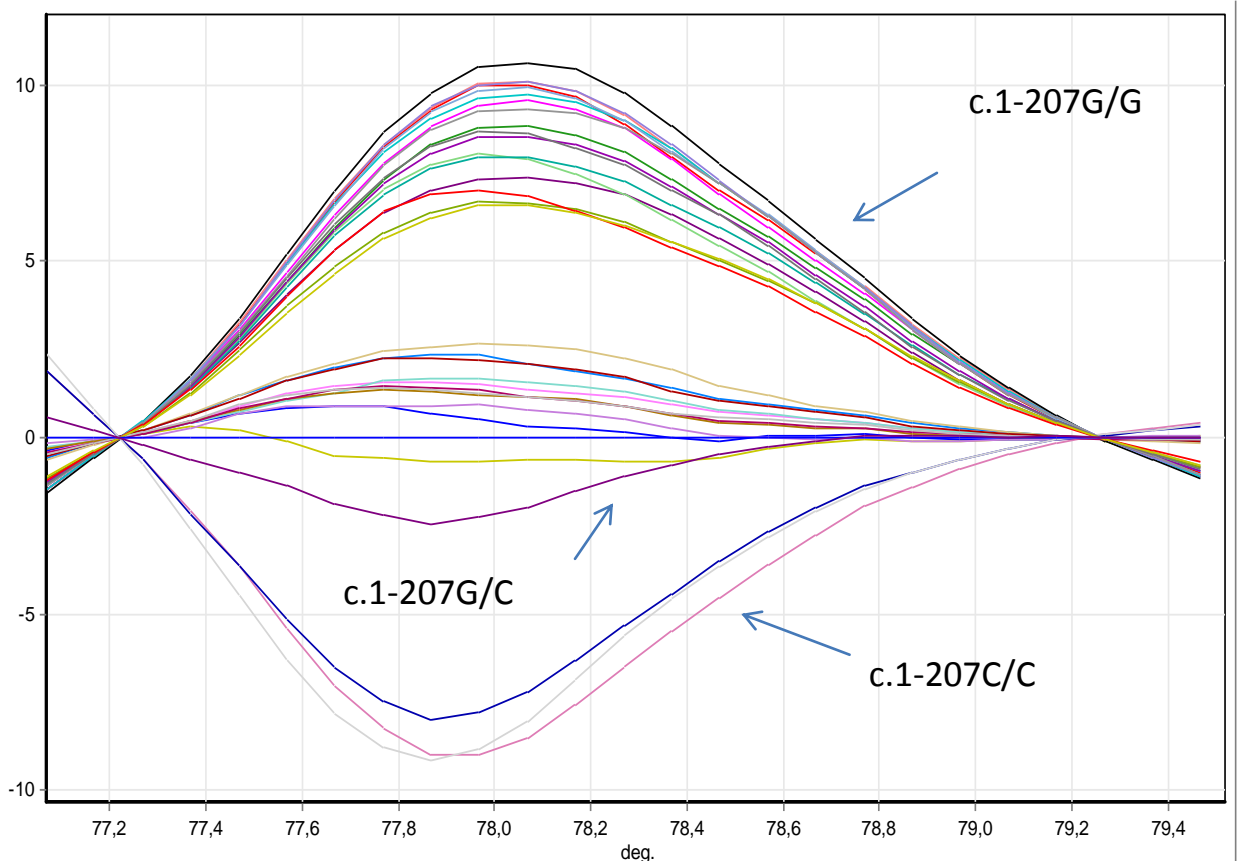
Ryc.38. Profile topnienia fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G>C w badanej grupie pacjentów



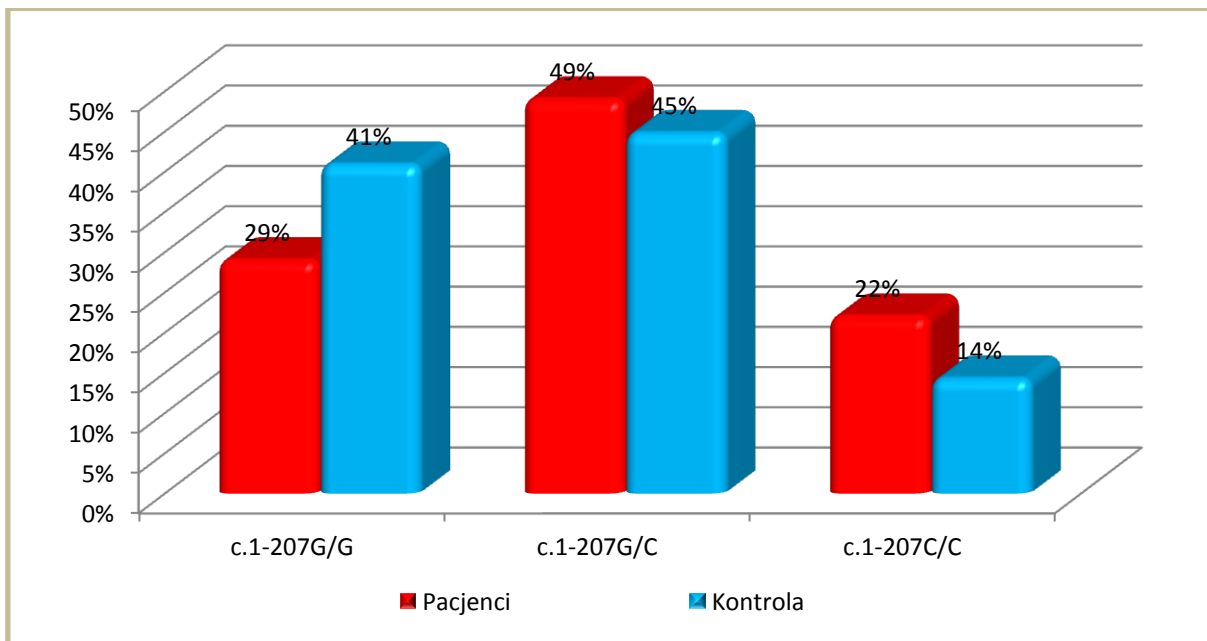
Ryc.39. Krzywe topnienia fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G>C w badanej grupie pacjentów



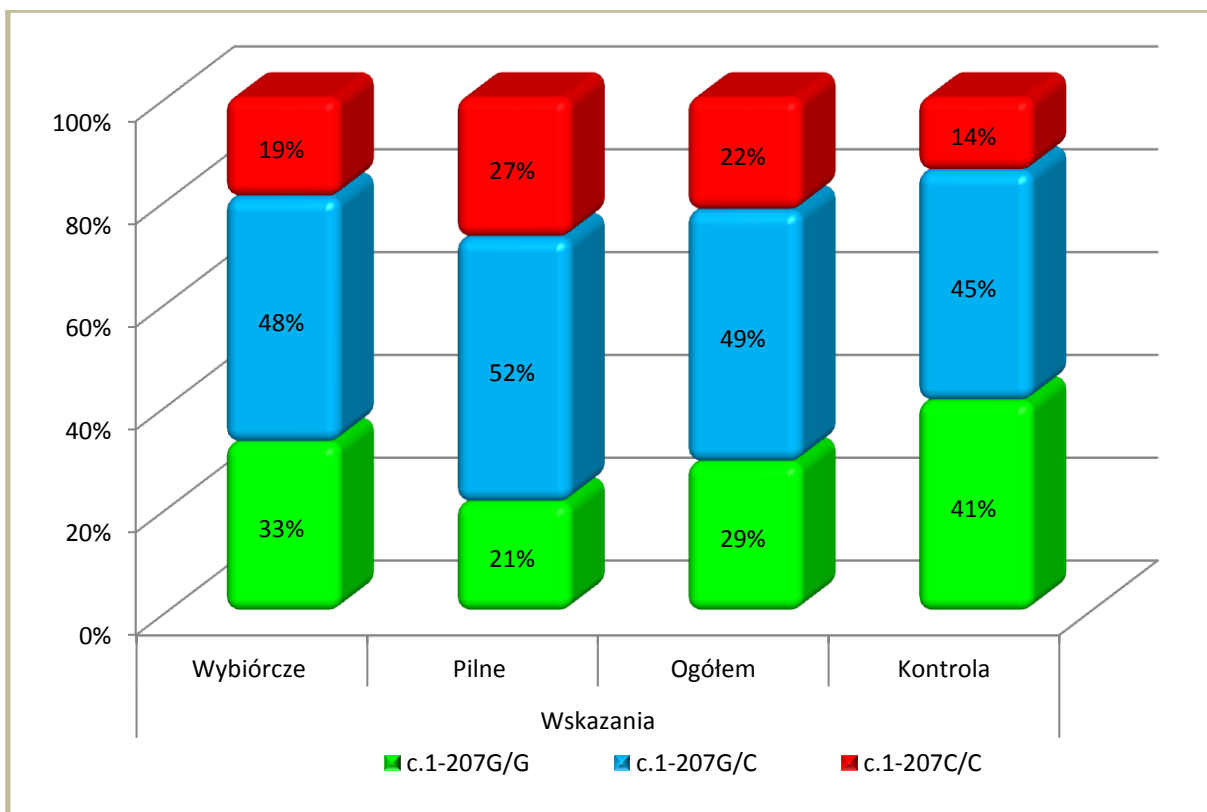
Ryc.40. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G>C w badanej grupie



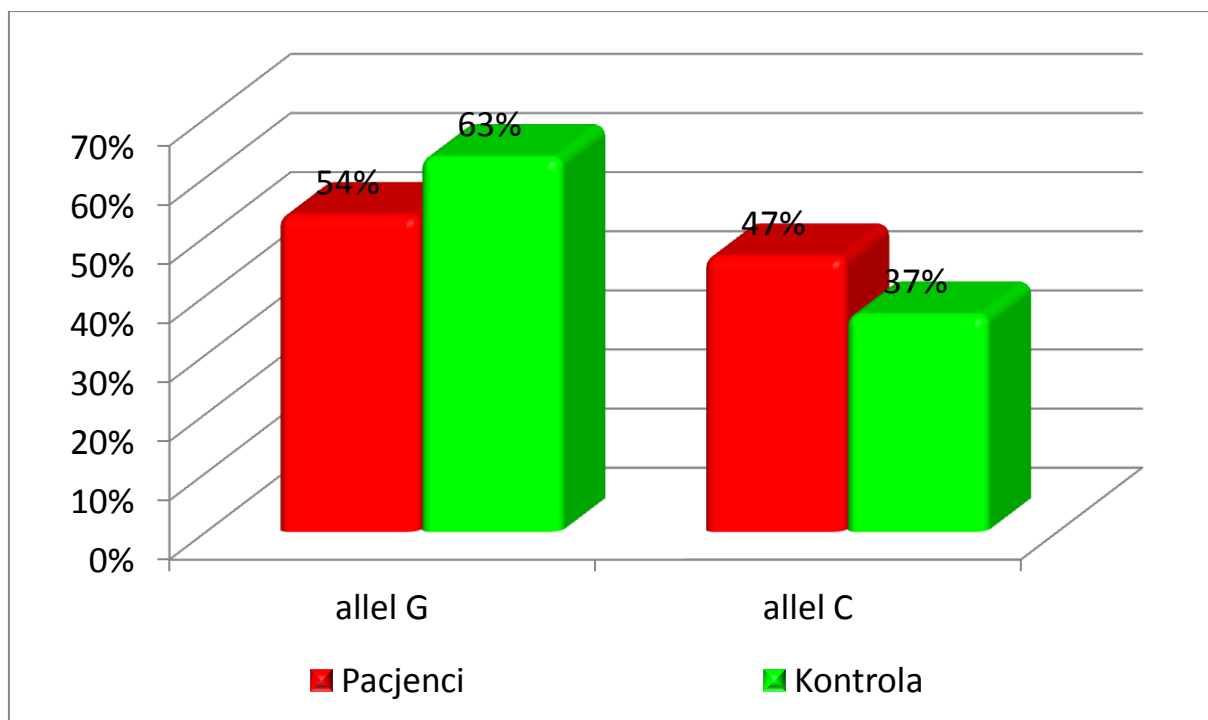
Ryc.41. Zestawienie częstości genotypów c.1-207G>C w genie *SLC22A5* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



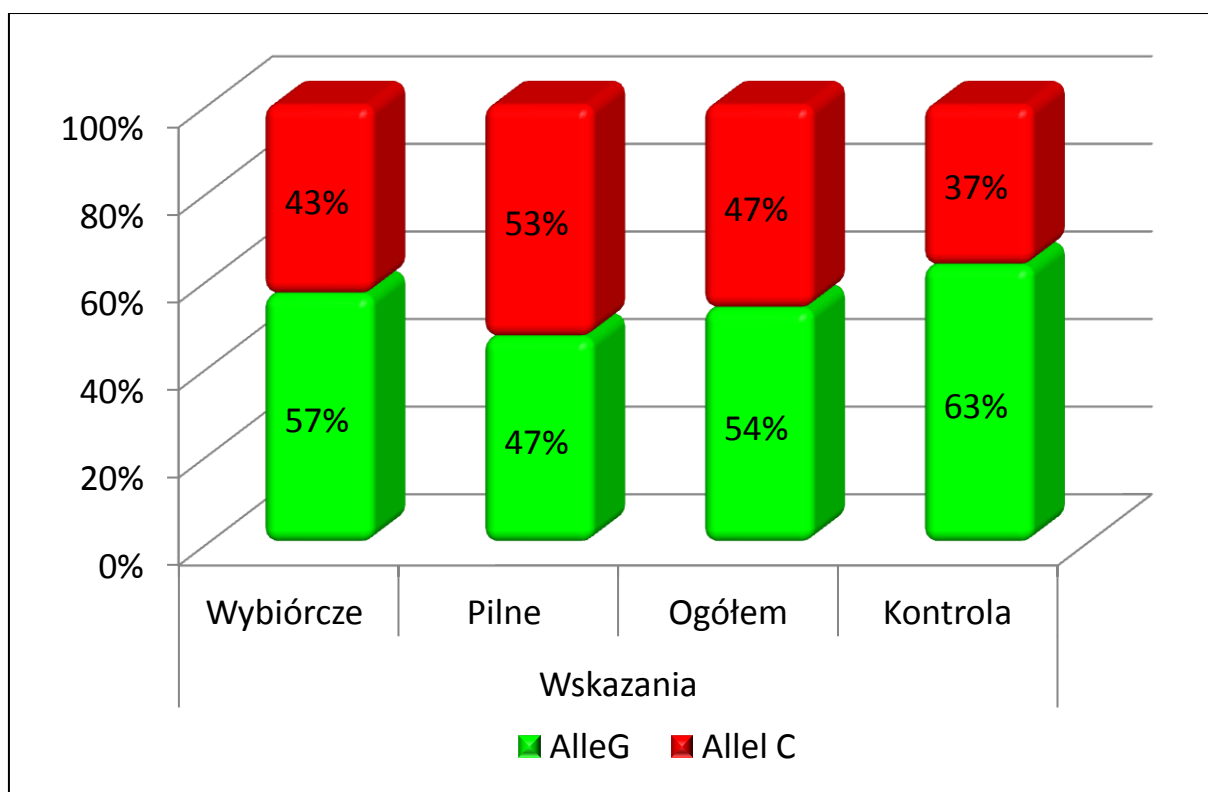
Ryc.42. Rozkład częstości genotypów wariantu c.1-207G>C w genie *SLC22A5* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego



Ryc.43. Częstości alleli wariantu c.1-207G>C w genie *SLC22A5* obserwowanych w grupie badanych chorych i grupie kontrolnej



Ryc.44. Częstości alleli wariantu c.1-207G>C w genie *SLC22A5* obserwowanych w badanej grupie z uwzględnieniem wskazania do zabiegu operacyjnego





### 3.2.2. Badanie częstości substytucji polimorfizmu c.1507C>T (rs1050152) w genie *SLC22A4*

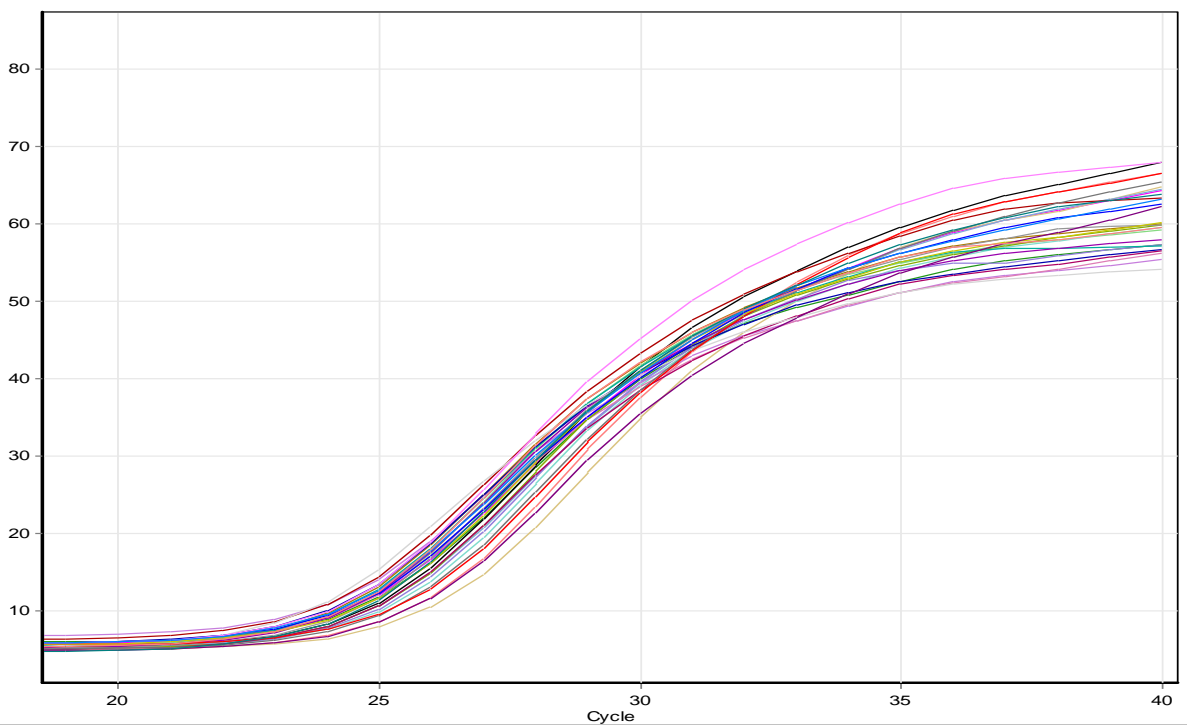
Badanie częstości występowania c.1507C>T w genie *SLC22A4* przeprowadzono z zastosowaniem analizy HRM. Fragment DNA obejmujący c.1507C>T został amplifikowany w reakcji PCR. Przyrost produktów reakcji mierzony w czasie rzeczywistym przedstawiono na rycinie 45. Dalsze etapy analizy prowadzone były analogicznie jak w poprzednich przypadkach. Profile topnienia przedstawiono na rycinie 46. Na podstawie krzywych wzorcowych określono genotypy dla poszczególnych próbek (Ryc.47).

W części przypadków identyfikację alleli c.1507C>T przeprowadzono na podstawie analizy restrykcyjnej, fragment DNA zawierający c.1507C>T hydrolizowano enzymem restrykcyjnym BamHI. Wariant c.1507C>T powoduje zanik sekwencji rozpoznawanej przez ten enzym. Obserwowano poszczególne genotypy jak na rycinie 48.

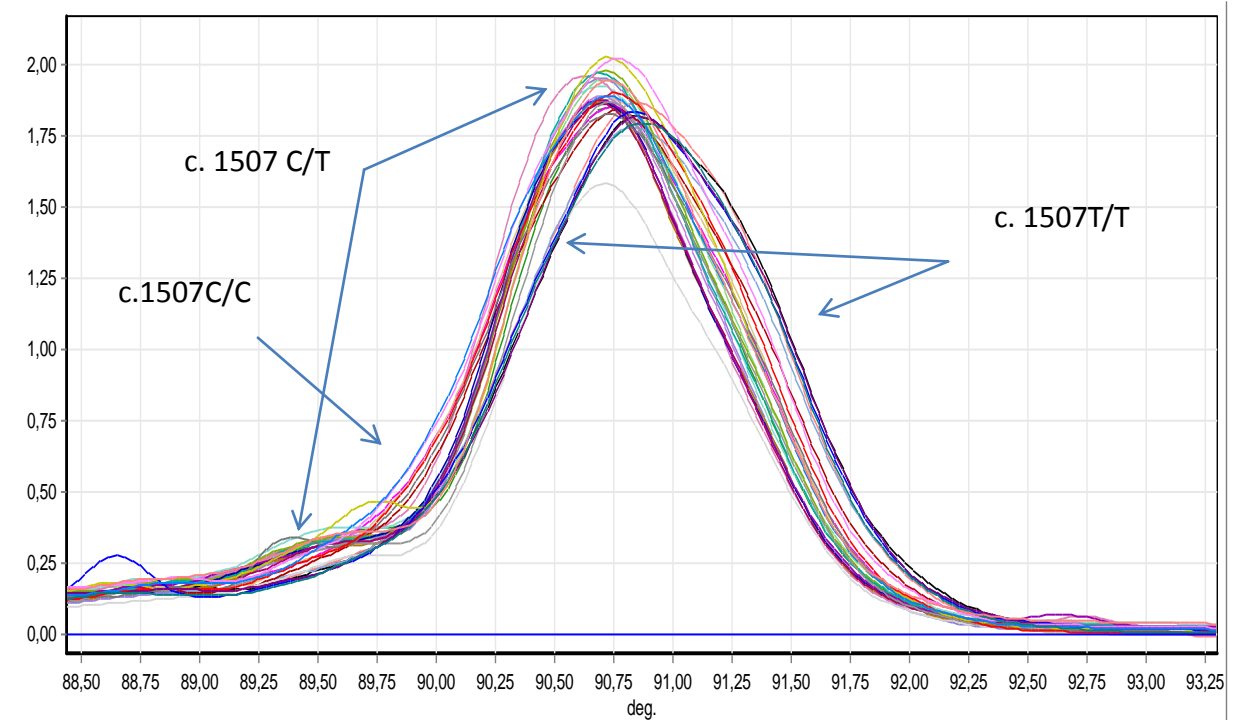
Częstości zidentyfikowanych genotypów w poszczególnych grupach się różnią. Częstość genotypu TT jest w grupie pacjentów ponad 3-krotnie wyższa niż w grupie kontrolnej (Ryc.49, Tab.22). Różnice w częstościach genotypów w grupie pacjentów ogółem i grupie kontrolnej są statystycznie istotnie różne przy  $p=0,0078$ .

Częstość allela T w grupie chorych to 44%, a w grupie kontrolnej 33% (Ryc.51, Tab.22). Różnica ta jest statystycznie znamienne przy  $p=0,0244$ . W badanej grupie chorych obserwuje się zróżnicowanie w częstości genotypów, jak i alleli w grupach operowanych ze wskazań wybiórczych i pozostałych (Ryc.50 i 52, Tab.21 i 22). W grupie operowanej ze wskazań pozostałych (pilnych i nagłych) obserwuje się podwyższoną częstość alleli związanych ze zwiększeniem ryzyka choroby. Częstość allela T w grupie pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych to 41%, a w grupie pozostałych pacjentów 47%. Również genotyp TT występuje w grupie pacjentów operowanych ze wskazań pilnych i nagłych z częstością wyższą o 5%. Różnice te nie są statystycznie istotne.

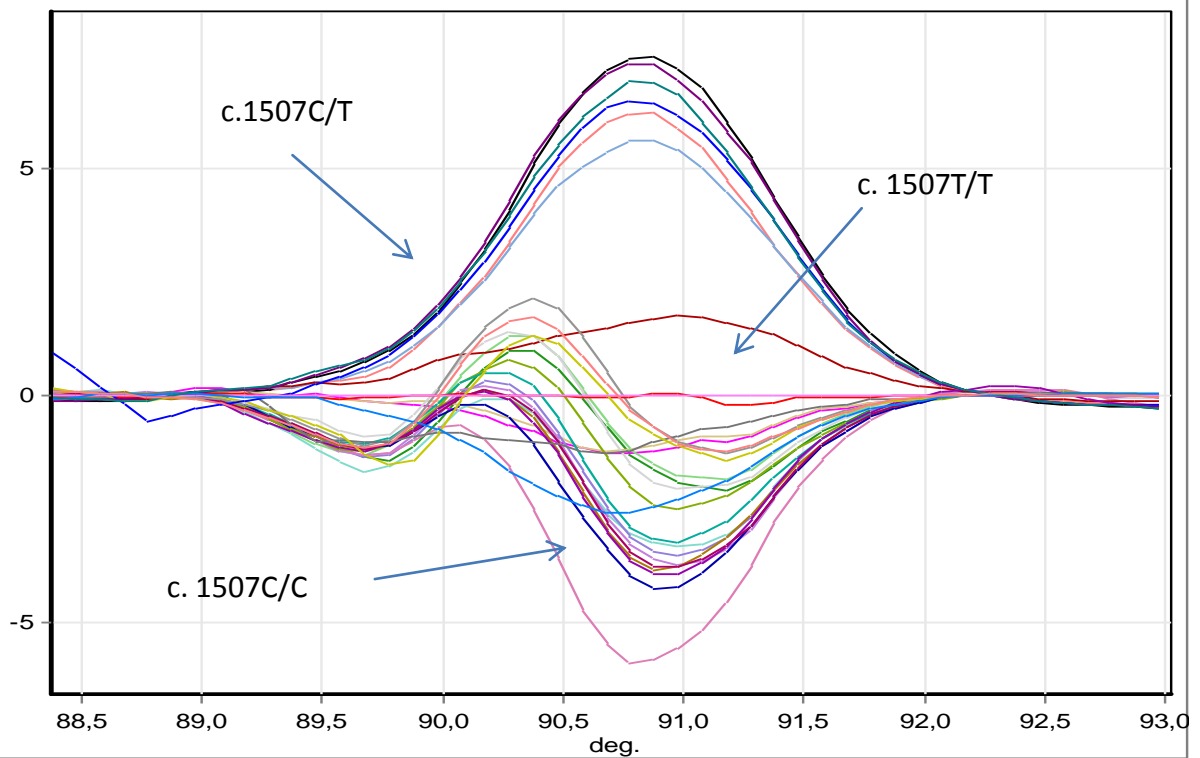
Ryc.45. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1507C/T w badanej grupie pacjentów



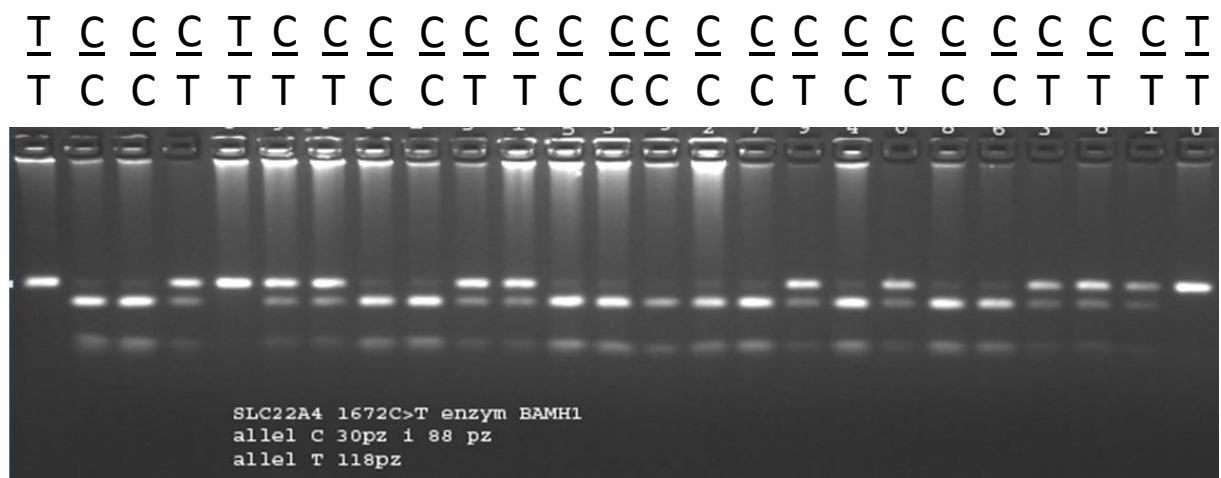
Ryc.46. Profile topnienia fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1507C/T w badanej grupie. Rozróżnienie alleli jest w tym przypadku trudne, jednak można zauważyć 3 różne profile topnienia



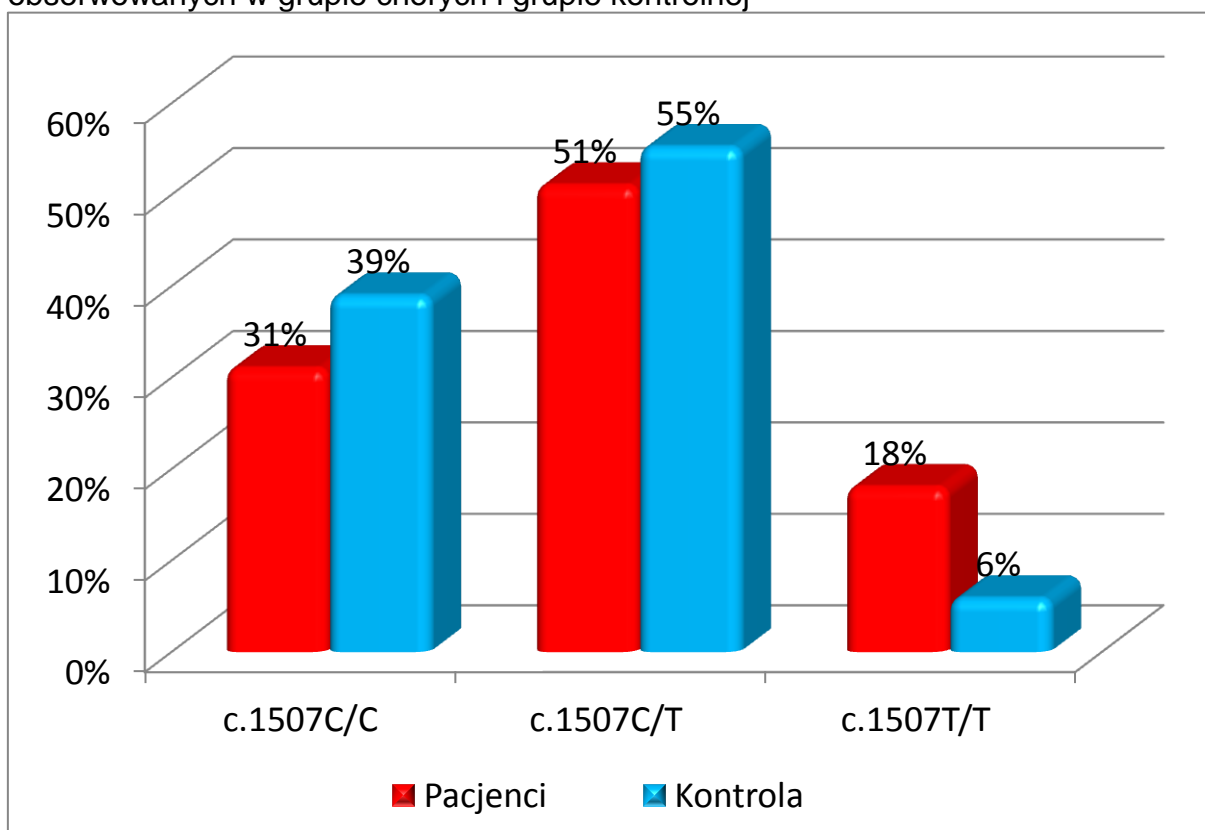
Ryc.47. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego (C/C) fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1507C>T



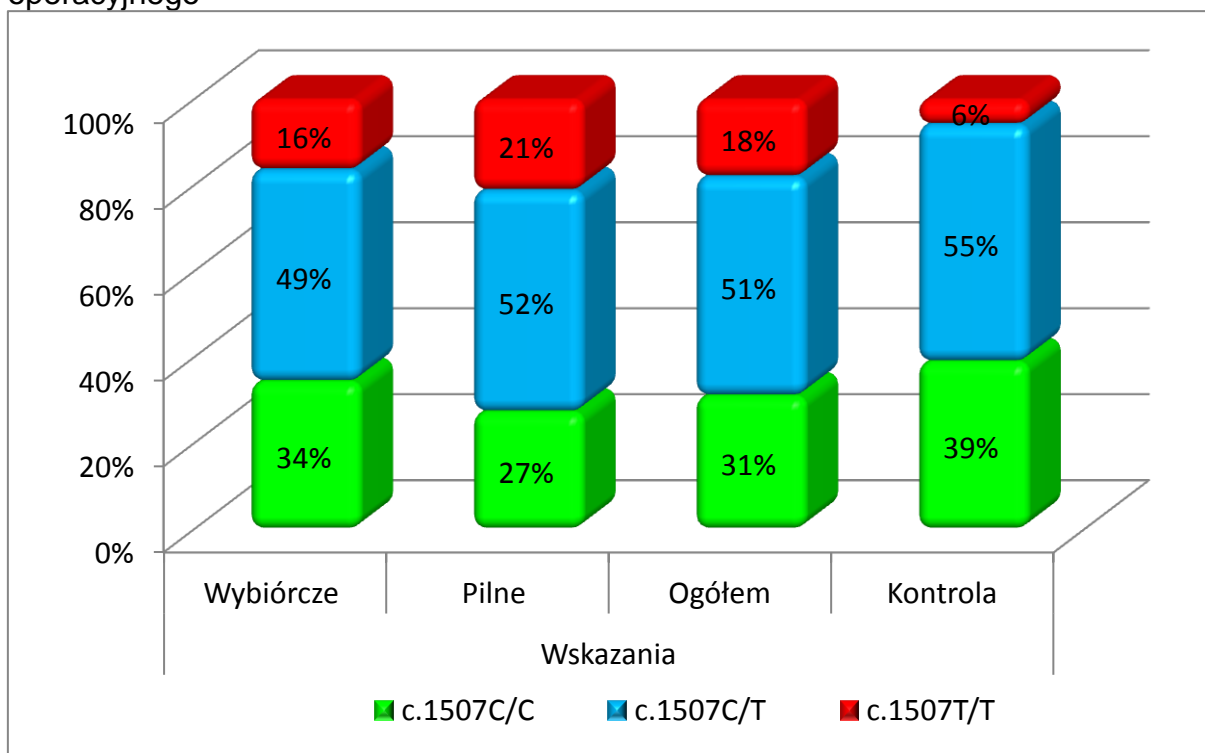
Ryc.48. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.1507C>T w grupie chorych. Genotypy podano w górnej części żelu. Produkt PCR 118 pz obejmujący fragment genu *SLC22A5* hydrolizowano enzymem restrykcyjnym BamH1. Hydrolizie ulega allel z wariantem dzikim C



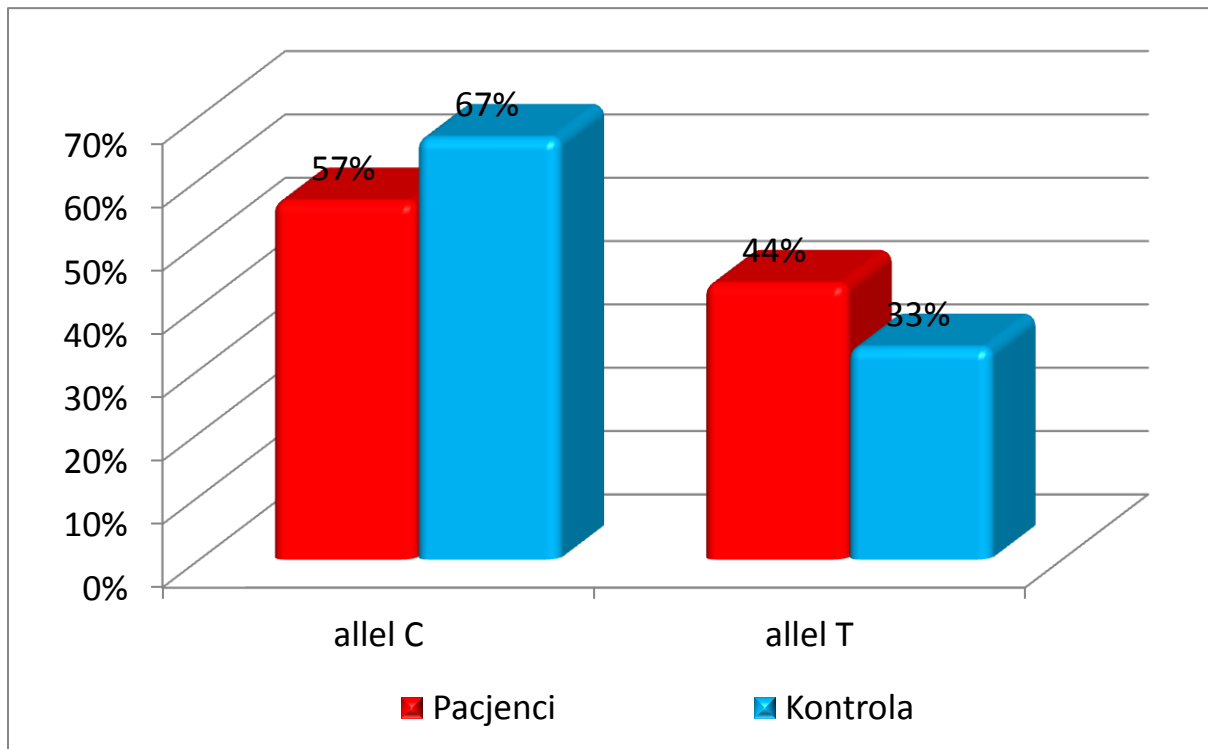
Ryc.49. Zestawienie częstości genotypów c.1507C>T w genie *SLC22A4* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



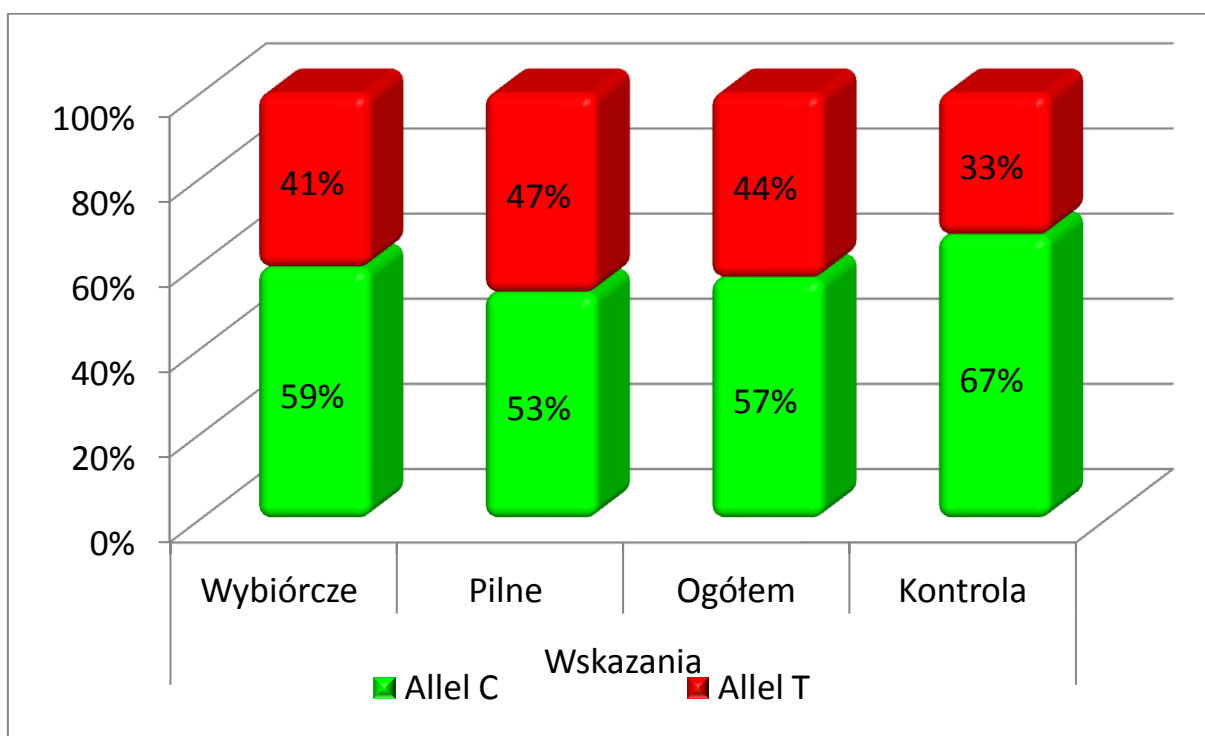
Ryc. 50. Rozkład częstości genotypów c.1507C>T w genie *SLC22A4* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego



Ryc.51. Zestawienie częstości alleli wariantu c.1507C>T w genie *SLC22A4* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc. 52. Rozkład częstości alleli c.1507C>T w genie *SLC22A4* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego



Tab.21. Częstości genotypów obserwowanych w genach *SLC22A5* i *SLC22A4*

	Homozygota typu dzikiego	Heterozygoty	Homozygota wariantu	Liczba badanych osób
Badany wariant	<i>SLC22A5</i> c.1-207G>C			
Genotyp	c.1-207G/G	c.1-207G/C	c.1-207C/C	
Wskazanie wybiórcze	22 (32,8%)	32 (47,8%)	13 (19,4%)	67
Wskazanie pilne	7 (21,2%)	17 (51,5%)	9 (27,3%)	33
Pacjenci ogółem	29 (29%)	49 (49%)	22 (22%)	100
Kontrola	63 (41%)	69 (45%)	22 (14%)	154
Badany wariant	<i>SLC22A4</i> c.1507C>T			
Genotyp	c.1507C/C	c.1507C/T	c.1507T/T	
Wskazanie wybiórcze *	23 (34,3%)	33 (49,3%)	11 (16,4%)	67
Wskazanie pilne *	9 (27,3%)	17 (41,5)	7 (21,2%)	33
Pacjenci ogółem *	31 (31%)	51 (31%)	18 (18%)	100
Kontrola	60 (39%)	85 (55%)	9 (6%)	154

\* rozkład częstości genotypów statystycznie istotnie różny w porównaniu z grupą kontrolną w teście Chi-kwadrat

Tab.22. Częstości alleli c.1-207G>C i c.1507C>T obserwowanych w genach *SLC22A5* i *SLC22A4*

	Allel polimorficzny	Allel dziki	Liczba badanych alleli
Badany wariant	<i>SLC22A4</i> c.1-207G>C		
Allel	C	G	
Wskazanie wybiórcze	58 (43,3%)	76 (56,7%)	134
Wskazanie pilne *	35 (53%)	31 (47%)	66
Pacjenci ogółem *	93 (46,5%)	107 (53,5%)	200
Kontrola	113 (37 %)	195 (63%)	308
Badany wariant	<i>SLC22A5</i> c.1507C>T		
Allel	T	C	
Wskazanie wybiórcze	55 (41%)	79 (59%)	134
Wskazanie pilne	31 (47%)	35 (53%)	66
Pacjenci ogółem *	87 (43 %)	113 (57 %)	200
Kontrola	103 (33%)	205 (67 %)	308

\* częstość alleli statystycznie istotnie różna w porównaniu z grupą kontrolną w teście dokładnym Fishera

### 3.4. Analiza molekularna genu *HPGD*

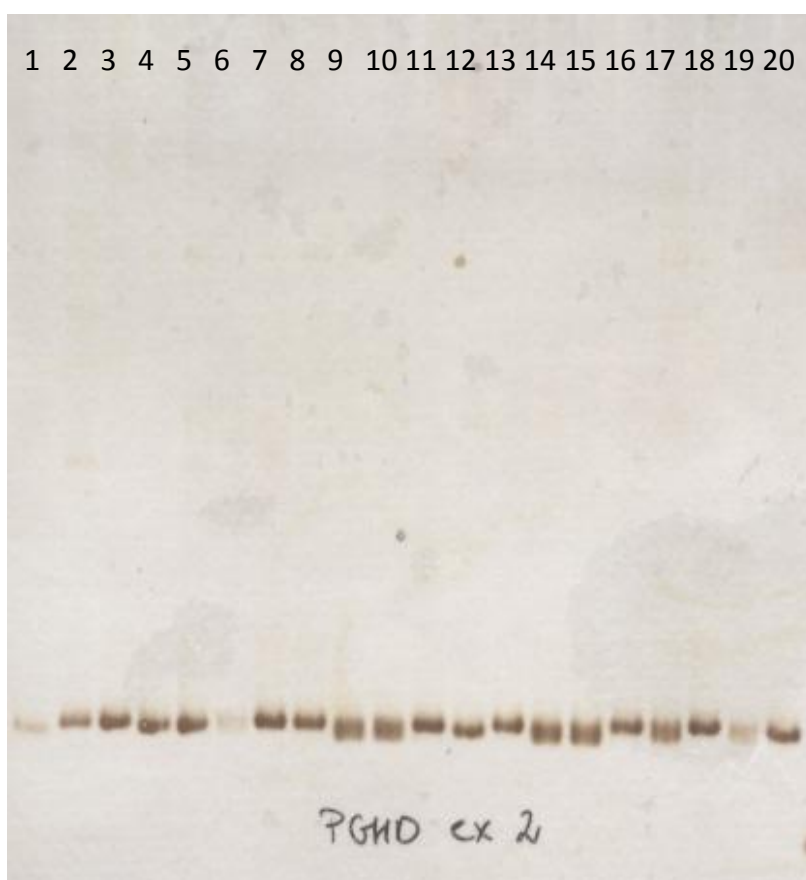
Przeanalizowano gen *HPGD* pod względem występowania mutacji i polimorfizmów. Wszystkie eksony genu zostały przeanalizowane pod względem występowania mutacji z zastosowaniem metod PCR-HD i PCR-SSCP. Przykładowe wyniki przedstawiono na rycinach 53, 54, 60, 61, 62, 65, 66, 67.

W eksonie 2 i intronie 4 zaobserwowano występowanie wariantów polimorficznych (Ryc.53, 54, 61, 62). Zidentyfikowano je na podstawie analizy sekwencji. Przykładowy wynik reakcji sekwencjonowania dla identyfikacji wariantów polimorfizmu c.168G>A przedstawiono na rycinie 55.

Wykryto 2 polimorfizmy: w eksonie 2 – c.168G>A i w intronie 4 – c.421+39C>T. Określono częstość ich występowania w badanej grupie pacjentów oraz w grupie kontrolnej (Ryc.56, 57, 58, 59, 63, 64; Tab.23 i 24). Obserwowane różnice w częstości sięgające nawet 9% nie są statystycznie istotne. Częstości występowania alleli polimorficznych w obu przypadkach jest wyższa o 7% w stosunku do grupy kontrolnej. Częstości genotypów c.421+39C/C są w grupie kontrolnej o 13 % wyższe niż w grupie pacjentów (Ryc.63). W przypadku polimorfizmu c.168G>A zróżnicowanie występuje również między grupami pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych i pozostałych (Ryc.57 i 59). W przypadku tego polimorfizmu u pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych obserwuje się zwiększoną częstość występowania allela polimorficznego, jak i genotypów polimorficznych. Różnice częstości genotypów obserwowane w badanych grupach nie wykazują jednak istotności statystycznej. W przypadku badania częstości alleli polimorfizmów c.168G>A i c.421+39C>T obserwowano statystycznie istotne różnice w ich częstości. W przypadku polimorfizmu c. 168G>A genu *HPGD* częstość allela A w grupie pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych jest statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną. Częstość allela T polimorfizmu c.421+39C>T genu *HPGD* jest w całej badanej grupie chorych statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną.

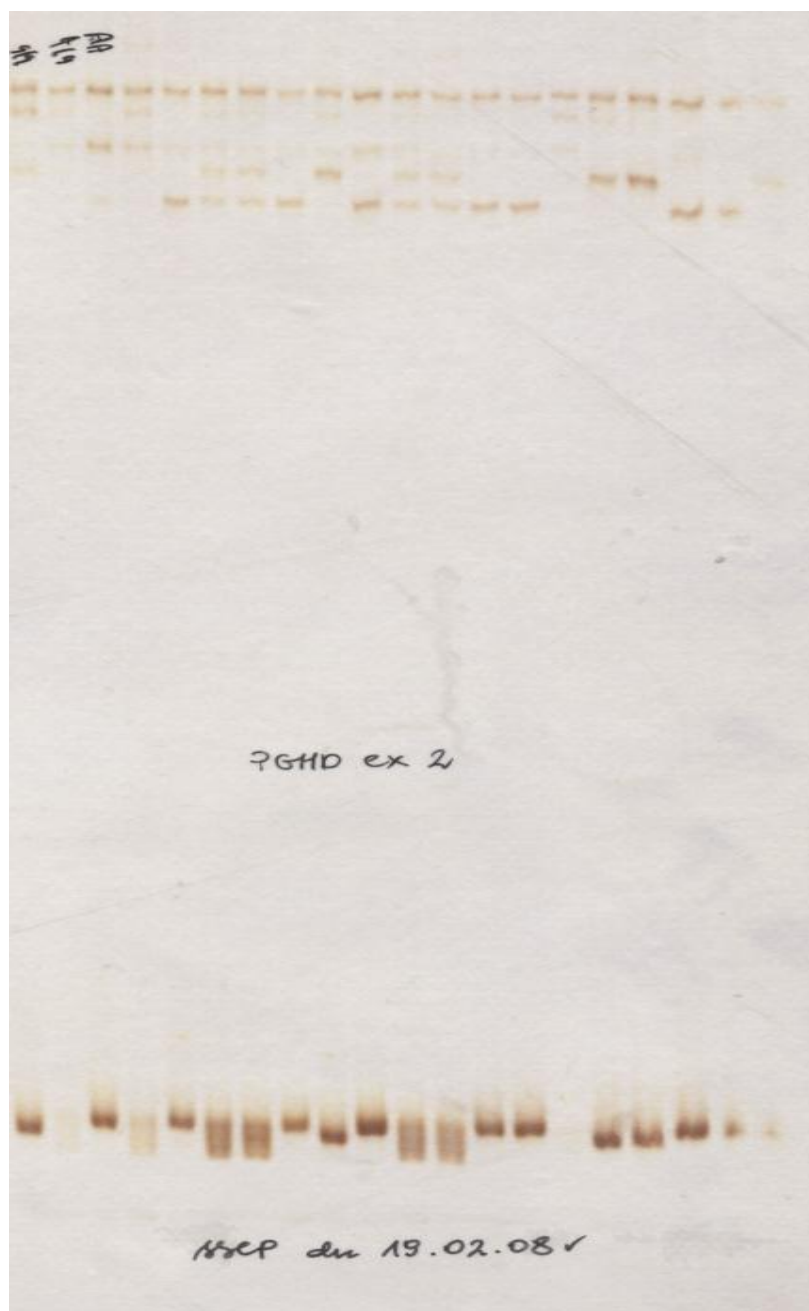


Ryc.53. Analiza PCR-SSCP eksonu 2 genu *HPGD* w grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 2 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. DNA wizualizowano poprzez srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Genotyp c.168A/A to tory 1, 12 i 10; genotyp c.168G>A to tory 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19; genotyp G/G to tory 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 16, 18, 20

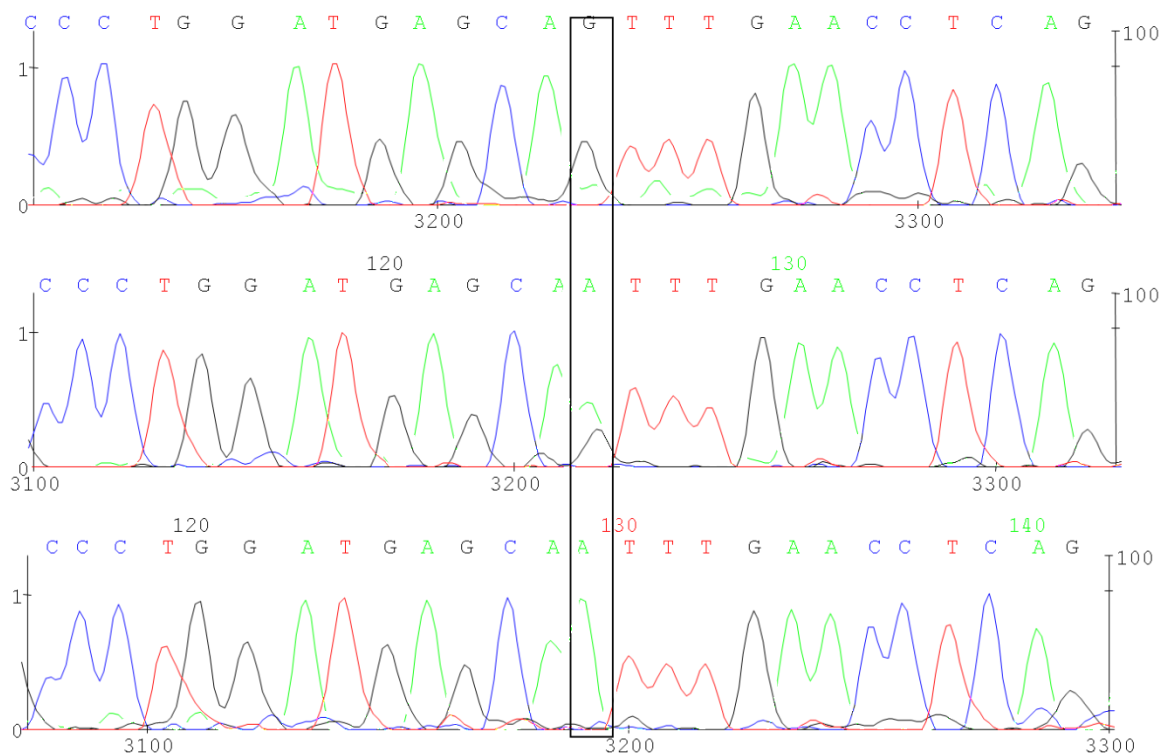


Ryc.54. Analiza PCR-SSCP eksonu 2 genu *HPGD* w grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 2 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. DNA wizualizowano poprzez srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Genotypy c.168A/A to linie: 1, 9, 15, 16, 20; genotyp G/A to linie: 2, 4, 6, 7, 11, 12; genotyp G/G to linie: 3, 5, 8, 10, 13, 14, 18, 19

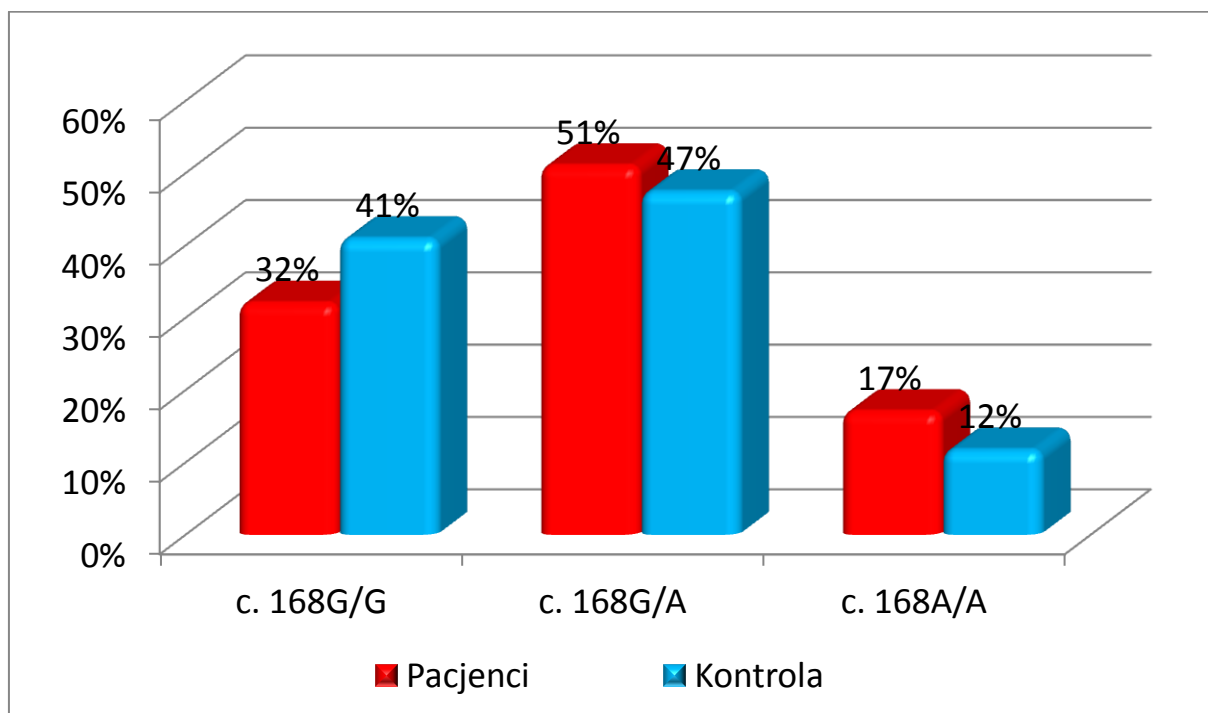
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



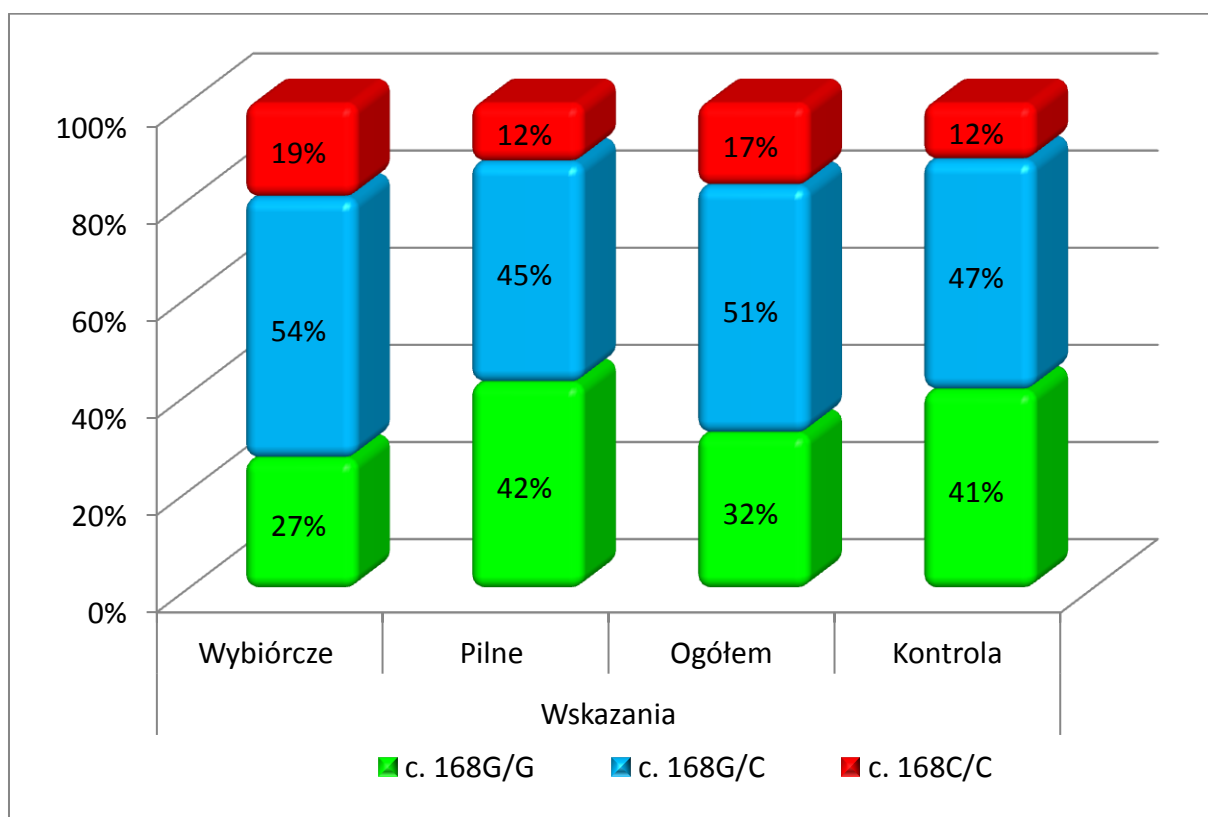
Ryc.55. Analiza sekwencji eksonu 2 genu *HPGD*. Produkt PCR oczyszczono i wykonano reakcje sekwencjonowania wg metody Sangera. Produkty reakcji oczyszczono i rozdzielono na sekwenatorze kapilarnym. Miejsce wystąpienia polimorfizmu c. 168G>A oznaczono ramką



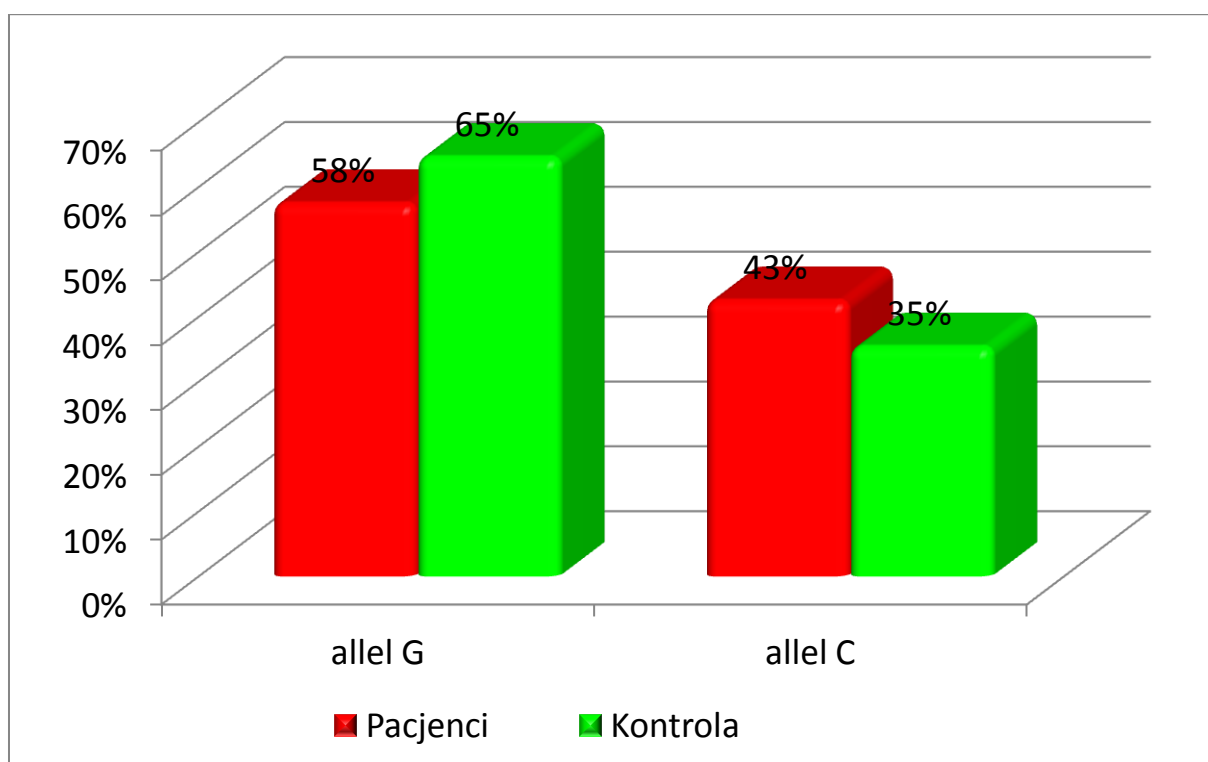
Ryc.56. Częstości genotypów wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



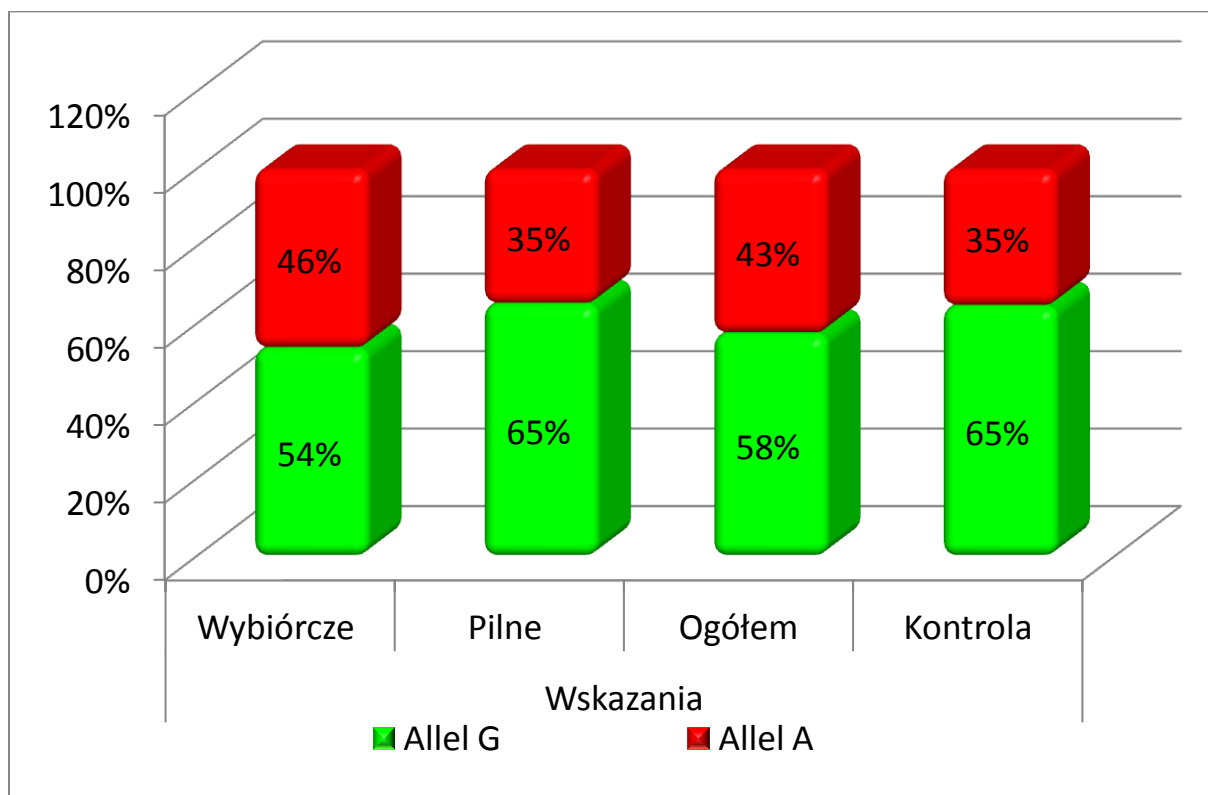
Ryc.57. Częstości genotypów wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w badanej grupie z uwzględnieniem wskazań do zabiegu operacyjnego



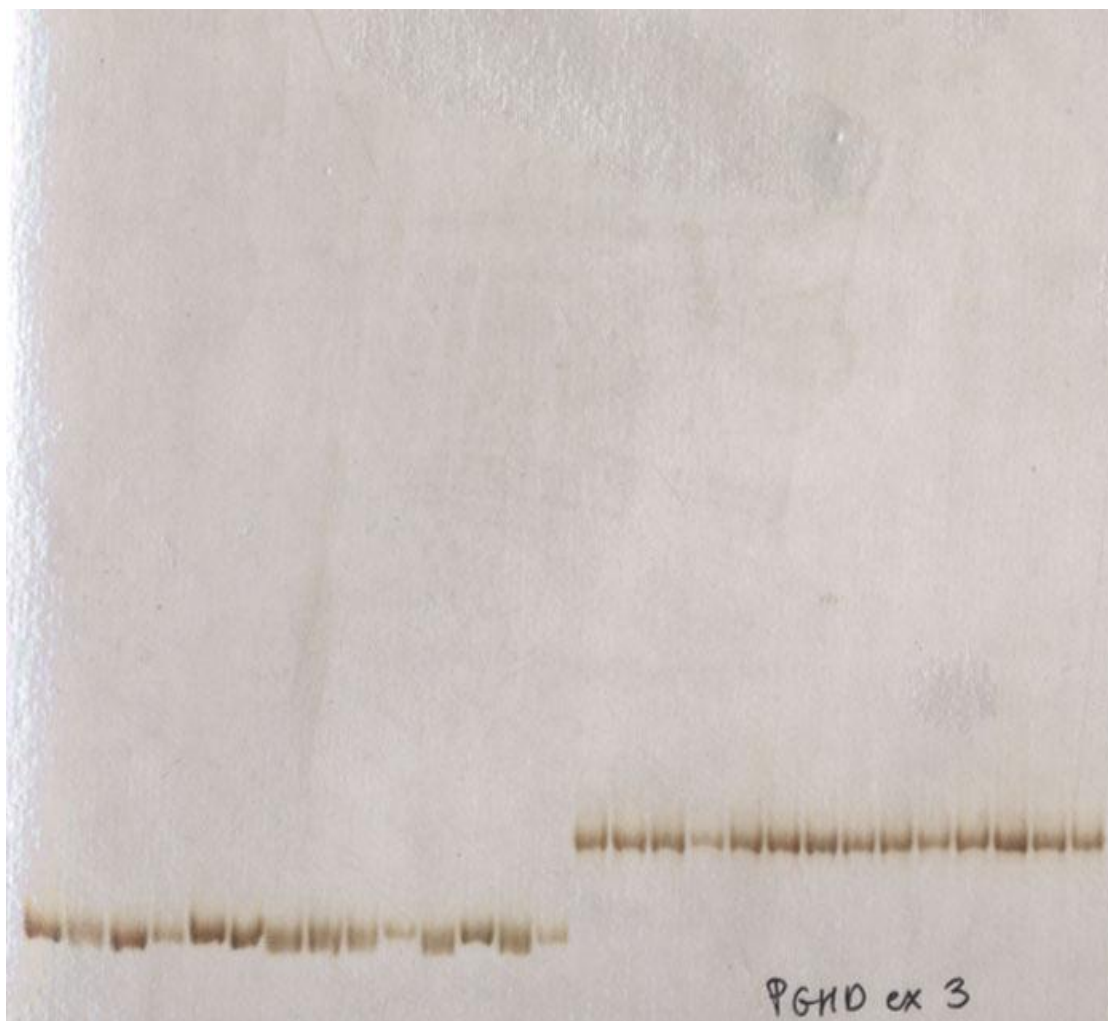
Ryc.58. Częstości alleli wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



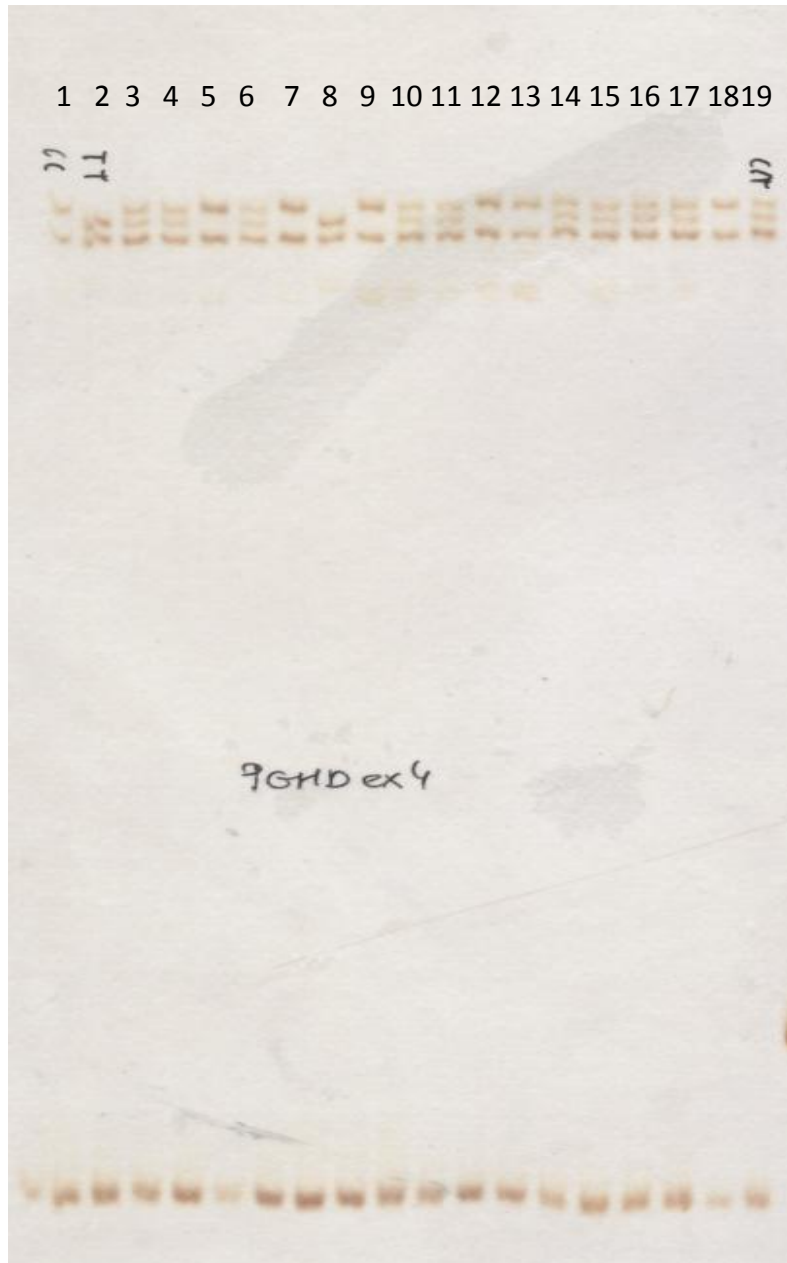
Ryc. 59. Częstości alleli wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w badanych grupach z uwzględnieniem wskazań do zabiegu operacyjnego



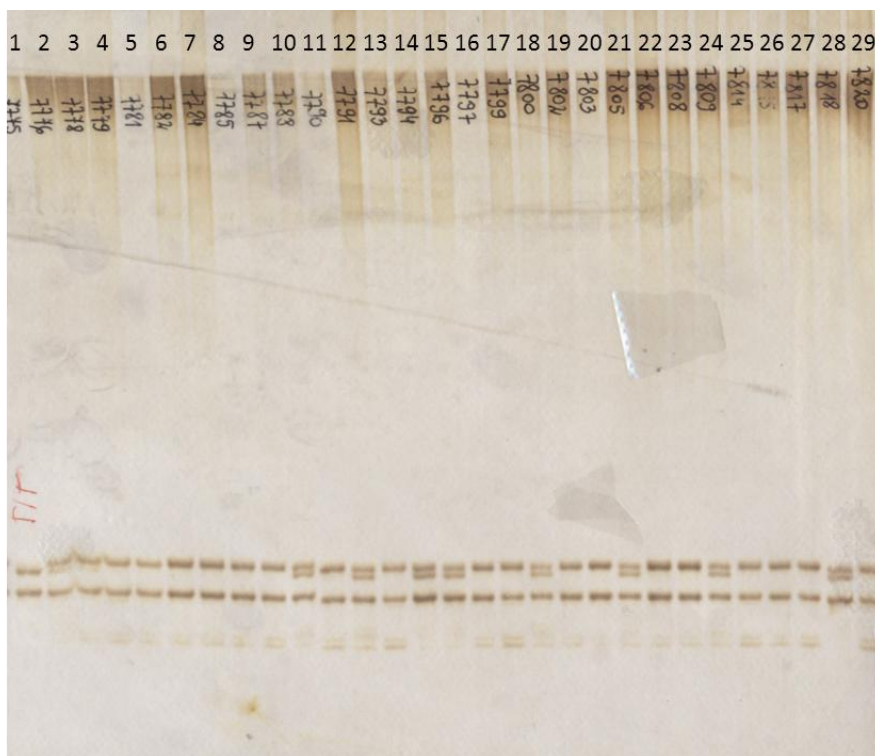
Ryc.60. Analiza PCR-HD eksonów 2 i 3 genu *HPGD* w grupie pacjentów. Produkty PCR obejmujące eksony 2 i 3 genu *HPGD* po denaturowaniu i powolnej renaturacji nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 4 amper przez 16h, w temperaturze 20°C. DNA wizualizowano poprzez srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Linie 1 do 14 analiza 14 pacjentów dla eksonu 2 genu *HPGD*. Genotypy c.168A/A to linie: 3, 6; genotyp G/A to linie 2, 7, 8, 9, 11, 13; genotyp G/G to linie 1, 4, 5, 10, 12, 14. Linie od 15 do 28 analiza 14 pacjentów dla eksonu 3 genu *HPGD*



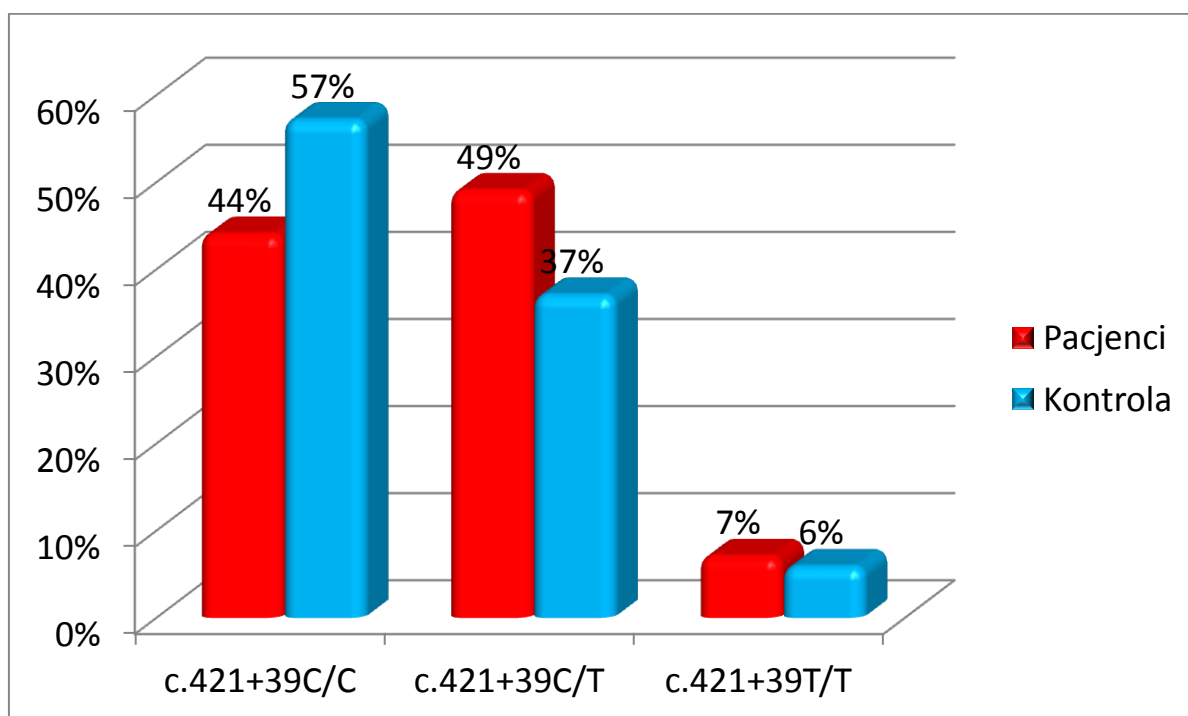
Ryc.61. Analiza PCR-SSCP eksonu 4 genu *HPGD* w grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 4 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. Genotypy c.421+39C/C to linie: 1, 5, 7, 9, 12, 13, 18; c.421+39C/T to linie: 3, 4, 6, 10, 11, 15, 15, 16, 17, 19; genotyp c.421+39T/T to linie: 2, 8



Ryc.62. Analiza PCR-SSCP eksonu 4 genu *HPGD* grupie kontrolnej. Produkt PCR obejmujący ekson 4 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. Genotyp c.421+39C/C to linie: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 15, 26, 27, 29. Genotyp c.421+39C/T to linie: 2, 10, 12, 14, 15, 19, 23, 27; genotyp c.421+39T/T to linia 1

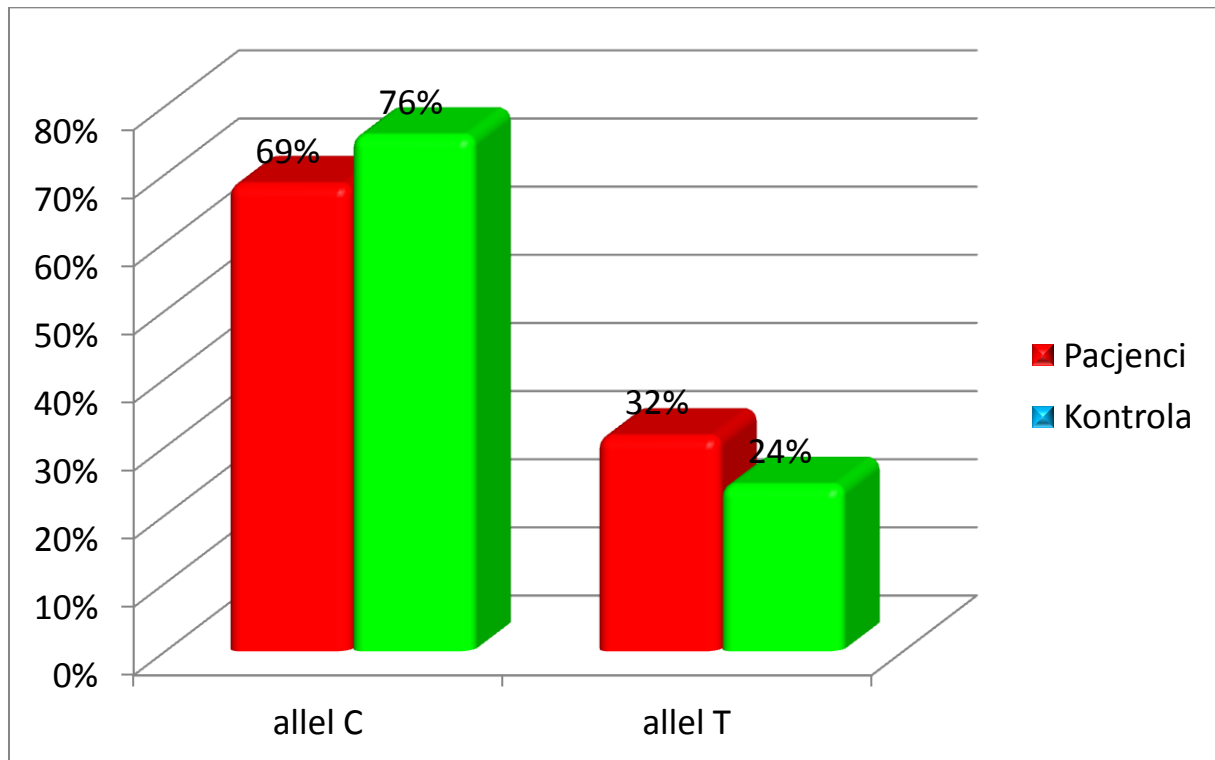


Ryc.63. Częstości genotypów wariantu c.421+39C>T w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej

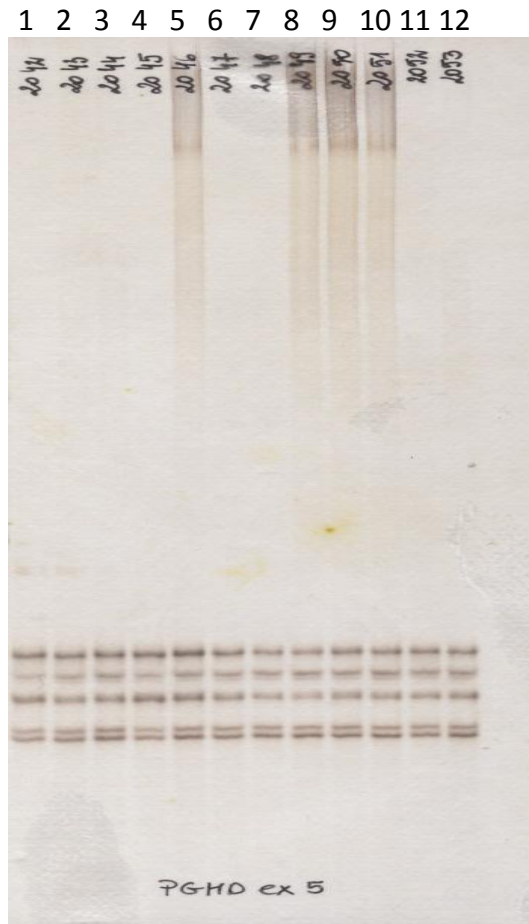




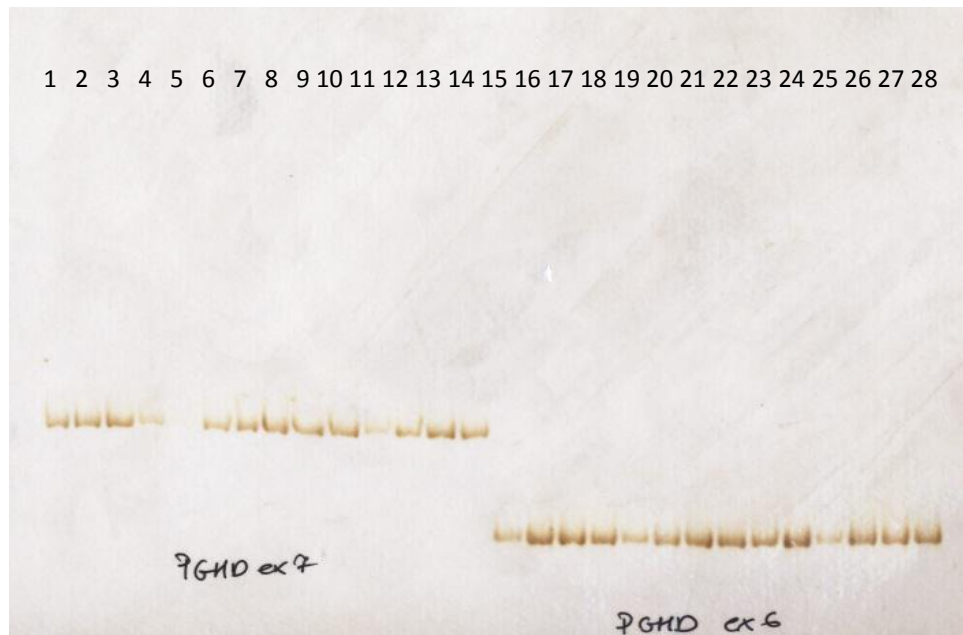
Ryc.64. Częstości alleli wariantu c.421+39C>T w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej



Ryc. 65. Analiza PCR-SSCP eksonu 5 genu *HPGD* w grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 5 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. W badanym fragmencie nie obserwowano odmiennego wzoru prążków



Ryc.66. Analiza PCR-HD eksonów 6 i 7 genu *HPGD* grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 6 lub 7 genu *HPGD* po denaturowaniu i powolnej renaturacji nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 4 amper przez 16h, w temperaturze 20°C. DNA wizualizowano poprzez srebrzenie przy użyciu azotanu srebra. Linie 1 do 14 analiza 14 pacjentów dla eksonu 7 genu *HPGD*; linie od 15 do 28 analiza 14 pacjentów dla eksonu 6 genu *HPGD*. W badanym fragmencie nie obserwowano heterodupleksów



Ryc.67. Analiza PCR-SSCP eksonu 7 genu *HPGD* grupie pacjentów. Produkt PCR obejmujący ekson 7 genu *HPGD* po denaturowaniu nałożono na 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przy natężeniu 6A przez 16h, w temperaturze 20°C. W badanym fragmencie nie obserwowano zmian w układzie prążków



Tab.25. Częstości genotypów w genie *HPGD*

	Homozygota typu dzikiego	Heterozygoty	Homozygota wariantu	Liczba badanych osób
Badany wariant	<i>HPGD</i> c. 168G>A			
Genotyp	c. 168G/G	c. 168G/A	c. 168A/A	
Wskazanie wybiórcze	18 (26,9%)	36 (53,7)	13 (19,4%)	67
Wskazanie pilne	14 (42,4%)	15 (45,5%)	4 (21,1%)	33
Pacjenci ogółem	32 (32%)	51 (51%)	17 (17%)	100
Kontrola	63 (41%)	73 (47%)	18 (12%)	154
Badany wariant	<i>HPGD</i> c.421+39C>T			
Genotyp	c.421+39C/C	c.421+39C/T	c.421+39T/T	
Wskazanie wybiórcze	30 (44,8%)	32 (47,8%)	5 (7,5%)	67
Wskazanie pilne	14 (42,4%)	17 (51,5%)	2 (6,1%)	33
Pacjenci ogółem	44 (44%)	49 (49%)	7 (7%)	100
Kontrola	88 (57%)	57 (37%)	9 (6%)	154

Tab.26. Częstości alleli w genie *HPGD*

	Allel polimorficzny	Allel dziki	Liczba badanych alleli
Badany wariant	<i>HPGD</i> c. 168G>A		
Allel	G	A	
Wskazanie * wybiórcze	72 (53,7%)	62 (46,3%)	134
Wskazanie pilne	43 (65,2%)	23 (34,8)	66
Pacjenci ogółem	115 (58%)	85 (42%)	200
Kontrola	199 (65%)	109 (35%)	308
Badany wariant	<i>HPGD</i> c.421+39C>T		
Allel	C	T	
Wskazanie wybiórcze	92 (68,7%)	42 (31,3%)	134
Wskazanie pilne	45 (68,2%)	21 (31,8%)	66
Pacjenci ogółem **	137 (68,5%)	63 (31,5%)	200
Kontrola	233 (76%)	75(24%)	308

\* częstości alleli statystycznie istotnie różne w porównaniu z grupa kontrolną w teście dokładnym Fishera

## V. DYSKUSJA

Zmiana geopolitycznej pozycji Polski w Europie i świecie oraz stopniowe bogacenie się społeczeństwa przyniosła nam zmiany nie tylko w życiu codziennym, ale zmodyfikowały również problemy zdrowotne naszego społeczeństwa. Wiele chorób dotychczas w głównej mierze spotykanych w krajach rozwiniętych europejskich czy północnoamerykańskich na stałe wpisuje się w obraz polskich szpitali i przychodni. Takim przykładem są nieswoiste zapalenia jelit, których rozpoznawanie i leczenie przez wiele lat rezerwowane było dla ośrodków akademickich, a obecnie coraz częściej wkracza do ośrodków rejonowych[134]. Nieswoiste zapalenia jelit dzielimy na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz nieokreślone zapalenia jelit.

Prezentowana rozprawa doktorska dotyczy 100-osobowej grupy pacjentów ze zdiagnozowanym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, którzy w latach 2007-2011 zostali przyjęci do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej w Poznaniu. W całej 100-osobowej grupie badanych pacjentów wdrożono leczenie chirurgiczne. 99 z nich miało wykonaną proktokolektomię odtwórczą z wytworzeniem zbiornika „J” z jelita końcowego oraz protekcyjną pętlową ileostomią. Jeden pacjent miał wykonaną kolektomię z wytworzeniem ileostomii końcowej na jelicie krętym. Wszyscy pacjenci byli oceniani zarówno pod względem klinicznym, jak i genetycznym.

W badaniach podjęto próbę oceny udziału czynników genetycznych w warunkowaniu ciężkiego przebiegu choroby i ewentualnego wskazania czynników prognostycznych dla przebiegu choroby.

W badanej grupie chorych 41% stanowiły kobiety, a 59% mężczyźni. Spora przewaga mężczyzn w porównaniu ze 154-osobową grupą kontrolną, gdzie częstość płci to 77 kobiet i 77 mężczyzn, nie wykazuje statystycznej znamienności. Dane te potwierdzają doniesienia literaturowe, gdzie również nie stwierdza się istotnej różnicy w zachorowalności u obu płci[135, 136]. Średni wiek postawienia diagnozy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wyniósł 35 lat, co bezpośrednio koreluje z wiekiem literaturowym zachorowalności ocenianym na 20-40 lat[137-139]. Podobnie rozkład badanej grupy pod względem dekady życia, w której choroba jest rozpoznawana, zgadza się z piśmiennictwem. Rozpoznawalność choroby w badanej grupie przypada na III i IV dekadę życia (po 24% przypadków), co pokrywa się z przytoczoną powyżej najwyższą zachorowalnością w wieku od 20 do 40 lat.

W badanej 100-osobowej grupie chorych wszyscy pacjenci byli leczeni chirurgicznie. Grupa ta stanowi dość specyficzną część populacji chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Byli to pacjenci przyjmowani albo ze wskazaniami do leczenia operacyjnego postawionymi przed hospitalizacją, albo pacjenci przyjmowani w trybie ostrym, z silnymi dolegliwościami, złym stanem ogólnym, którzy mieli znacznie większe prawdopodobieństwo potrzeby

leczenia chirurgicznego w porównaniu z całą populacją chorych na CU. Można zatem powiedzieć, że jest to grupa, chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego o bardzo ciężkim przebiegu, źle reagującą na leczenie farmakologiczne.

W literaturze panuje zgoda co do odsetka pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i wymagających leczenia operacyjnego. Stanowią oni około 20%. Nie ma jednoznacznych danych, w jakich dokładnie przypadkach ta operacja powinna zostać wykonana, nie ma również szczegółowych danych, po jakim czasie od rozpoznania powinno się te zabiegi wykonać. Niektórzy uważają, że chorujących na CU można podzielić na 3 grupy chorych w zależności od wieku zachorowania: A1: < 16 roku życia; A2: 16–40 roku życia i A3: >40 roku życia. Pacjenci z grupy A1 mają cięższy przebieg choroby i większe prawdopodobieństwo kolektomii we wczesnym okresie choroby[137, 139]. Prawdopodobieństwo to maleje wraz z wiekiem i jest najmniejsze w grupie A3[140, 141].

Wielu gastroenterologów dziecięcych jest zdania, że przebieg choroby u dzieci jest tak odmienny od objawów w wieku dorosłym, że należałoby wprowadzić zupełnie odmienną skalę i klasyfikację CU dla osób poniżej 16 roku życia[142].

W badanej grupie chorych średni okres pomiędzy rozpoznaniem a operacją to 6 lat. Średnia ta nie ma jednak znaczenia, gdy zwrócimy uwagę na rozpiętość okresów pomiędzy rozpoznaniem a operacją w badanej populacji, który wynosił 26 lat. Musimy również brać pod uwagę fakt, że znaczna część pacjentów z badanej grupy była przyjmowana w trybie pilnym i nagłym, co wymagało natychmiastowej operacji. W tym badaniu nie mamy wglądu, jak nasza grupa pacjentów wygląda na tle całej populacji chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, a nasze obserwacje różnią się od literaturowych. 25% pacjentów zostało poddanych zabiegowi operacyjnemu w okresie poniżej 1 roku od czasu diagnozy choroby i średnia wieku dla tej grupy wynosi 40 lat. W związku z tym obserwuje się, że w grupie leczonych operacyjnie cięższy przebieg choroby i bardziej ostry występuje u pacjentów, u których rozpoznanie choroby nastąpiło w wieku między 30 a 50 rokiem życia. Na rycinie 6 przedstawiono czas od momentu rozpoznania choroby do czasu zabiegu operacyjnego. Wynika z niej, że w naszej grupie przytoczony podział na grupy A1, A2 i A3 się nie sprawdza. Najkrótszy okres obserwowano w grupie A3 (powyżej V dekady życia), co jest całkowicie sprzeczne z powyżej przedstawioną regułą. Ponownie może to się wiązać z charakterem przyjmowanych pacjentów, często w ciężkim stanie oraz rozbieżną opinią środowiska chirurgicznego i gastroenterologicznego na temat wskazań do szybkiego wdrażania procedury chirurgicznej[143].

Klasyfikacja montrealaska wg Silverberga z 2005 roku jest najbardziej rozpowszechnioną klasyfikacją CU. Łączy ona zarówno lokalizację choroby poprzez ocenę rozległości zmian w jelicie grubym, jaki i ciężkość rzutu



choroby[31-33]. Obecnie ciężkość rzutu choroby najczęściej ocenia się za pomocą kryteriów wg Truelove'a i Wittsa w modyfikacji ECCO[34, 144-148].

W badanej grupie chorych cecha „E” klasyfikacji montrealskiej w 90% wynosi 3. W całej populacji chorych na CU tylko 20% pacjentów ma zmiany rozciągające się do kątnicy w chwili rozpoznania choroby i wykonania pierwszej endoskopii. Ale biorąc pod uwagę fakt, że badana populacja to pacjenci operowani, u których wykonano kolektomię, to procent ten nie jest przesadzony.

Oceniając cechę „S” w klasyfikacji montrealskiej stwierdzono, że 55% badanych chorych było kwalifikowanych do zabiegu z wynikiem S2. Należy jednak rozróżnić chorych, którzy trafili do oddziału w trybie ostrym od pacjentów hospitalizowanych w trybie planowym. Znaczna część pacjentów przyjętych w trybie ostrym, nierzadko przekazana w ciężkim stanie z innych ośrodków, miała nagłe lub pilne wskazania do operacji i była oceniana na S3 w klasyfikacji montrealskiej. Oddzielna grupą byli pacjenci przyjmowani planowo, najczęściej na ustalonym leczeniu zachowawczym, którzy bardzo rzadko trafiali do szpitala z pilnymi wskazaniami do operacji. Byli to pacjenci kwalifikowani do zabiegu ze wskazań wybiórczych, stąd często oceniani byli na S1 w skali montrealskiej.

Współczynnik aktywności choroby (DAI Score; Mayo Score) opracowany przez Sutherlanda i wsp. ma na celu połączenie dwóch podstawowych objawów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, takich jak ilość stolców oddawanych na dobę i obecność krwi w stolcu z ogólną lekarską oceną aktywności choroby oraz obrazem endoskopowym. Każda cecha oceniana jest od 0 do 3, gdzie 3 określa najcięższe objawy, tj. ilość wypróżnień powyżej 4 na dobę, obecność dużej ilości czystej krwi w stolcu, ciężki przebieg choroby w ocenie lekarskiej i znaczne nasilone objawy w ocenie endoskopowej[55, 56]. Nasilenie objawów endoskopowych oznacza się głównie według klasyfikacji Barona i wsp., gdzie oceniany jest stopień krwawliwości śluzówki lub w modyfikacji tej klasyfikacji, w której oceniany jest też obrzęk śluzówki, zaczerwienienie, kruchość, granulowanie oraz obecność owrzodzeń i wysięku. Innymi skalami oceniającymi obraz endoskopowy, również rekomendowanymi przez ECCO, są klasyfikacje Schroedera i Feagana[149-151]. Rozwój i szeroka dostępność badań endoskopowych wyparły klasyfikację bazującą na wyniku biopsji odbytnicy wg Morsona z 1981r.[152].

Część pacjentów poddawanych badaniu kolonoskopowemu podczas hospitalizacji była oceniana na podstawie tego badania. U części – głównie kierowanych do zabiegu operacyjnego z przyczyn wybiórczych, w trybie planowym – ocena obrazu endoskopowego była wykonywana na podstawie ostatniego wyniku badania przed hospitalizacją.

Średnia punktowa DAI Score wyniosła 9, ale zwraca uwagę obecność dwóch najczęstszych wartości: 7pkt. i 10-11pkt. Wiąże się to również z dwoma grupami wskazań do operacji: wybiórczych i pilnych/nagłych. W pierwszym

przypadku wartość punktowa w większości przypadków jest mniejsza ze względu na planowy tryb przyjęcia i mniejszą aktywność choroby.

Znaczna ilość chorych (nawet 35%) na wrzodziejące zapalenie jelita grubego ma dodatkowe objawy ze strony innych narządów[153]. Najczęściej manifestacja pozajelitowa CU dotyczy układu mięśniowo-szkieletowego. Zwykle są to zapalenia pojedynczych stawów, głównie kolanowych, łokciowych, skokowych lub stawów nadgarstka. Zapalenie ma charakter wędrujący, a objawy zwykle ustępują po włączeniu typowego leczenia. W grupie badanej żaden pacjent nie manifestował takich objawów, mimo że dotyczy ono, wg różnych źródeł, do 30% chorych[154]. U trzech pacjentów zdiagnozowano natomiast zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, co stanowi 3% badanej grupy chorych i bezpośrednio koreluje z danymi literaturowymi podającymi współistnienie ZZSK z CU u 2-4% pacjentów[155-158]. Zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa nie ma związku z aktywnością choroby i może postępować mimo leczenia choroby zasadniczej. U jednego pacjenta zdiagnozowano zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych. Brak korelacji z danymi wykazującymi współwystępowanie tego schorzenia z CU nawet w 80% wynika z braku specyficznych objawów, a często bezobjawowym przebiegiem tej choroby[159, 160].

Zgorzelinowe zapalenie skóry (ang. *pyoderma gangrenosa*) to powikłanie ze strony skóry pojawiające się najczęściej w ciężkim rzucie choroby. Według różnych źródeł dotyczy od 1-5% chorych na CU. W badanej grupie chorych stwierdzono to schorzenie u trzech pacjentów, co stanowi 3% grupy badanej. Innych powikłań ze strony skóry i tkanki śluzowej, jak rumień guzowaty czy owrzodzenia jamy ustnej, nie obserwowano[161, 162].

Zmiany oczne bardzo często stanowią powikłania ostrego rzutu CU. Najbardziej charakterystyczna zmiana, czyli zapalenie tęczówki, była obserwowana u jednego chorego. Innych zmian ocznych, jak zapalenie spojówek, zapalenie naczyńówki i zapalenia twardówki, nie obserwowano. W literaturze przyjmują się, że zmiany te występują u 1.5 – 7.5% pacjentów z CU[163].

Ostatnim powikłaniem pozajelitowym w badanej grupie chorych był jeden przypadek pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (łac. *cholangitis sclerosans primaria*). Według danych literaturowych występuje ono w 2-4% przypadków CU[155]. *Cholangitis sclerosans* charakteryzuje się zapaleniem, a następnie włóknieniem wewnątrz- i zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych[164-166]. Powikłanie to częściej występuje u mężczyzn z rozległym zapaleniem jelita grubego. Z biegiem czasu choroba prowadzi do żółciowej marskości wątroby i do raka dróg żółciowych[167-169].

Ze względu na brak wyników densytometrycznych pacjentów pominięto w ocenie chorych najczęstsze powikłanie pozajelitowe – osteopenię i osteoporozę, która występuje nawet u 70% chorych na CU[170-172].

U pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego istnieje istotnie zwiększone ryzyko rozwoju raka tego narządu[173-175].

Czynnikami predysponującymi do rozwoju raka w przebiegu CU jest długi okres trwania choroby (8-10 lat), rozległe zajęcie jelita przez proces chorobowy, towarzyszące pierwotne stwardniejące zapalenie dróg żółciowych, wczesny początek choroby oraz obciążony wywiad rodzinny w kierunku raka jelita grubego.[176-184] Znacznie mniejsze ryzyko rozwinięcia raka jelita grubego jest u pacjentów z mniejszą rozległością zmian w jelicie (E2 w klasyfikacji montrealskiej). Uważa się, że u chorych ze zmianami ograniczonymi do odbytnicy (E1) nie ma zwiększonego ryzyka powstawania raka.[185] Rak jelita grubego u chorych CU ma nieco inny charakter niż u pozostałej części populacji, często jest wielogniskowy i nie rozwija się klasycznie z gruczolaka[186-189].

W badanej grupie chorych nowotwór stwierdzono u 5 chorych (5% pacjentów), w tym u jednego pacjenta rozpoznano raka synchronicznego usytuowanego w odbytnicy i kątnicy. Dane te korelują z danymi literaturowymi, które ryzyko raka u chorych z CU szacują na 3-5%[190, 191].

Ryzyko rozwoju raka jelita grubego u pacjentów z CU, szczególnie przy zajęciu całej długości jelita i ponad 8-letnim okresem trwania choroby, jest na tyle duże, że wymaga ciągłego nadzoru onkologicznego pod postacią powtarzanych badań endoskopowym co 1-2 lata z pobraniem licznych wycinków z każdej okolicy jelita grubego.

Leczenie operacyjne jest konieczne u 20-25 pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Złotym standardem od wielu lat pozostaje proktokolektomia odtwórcza z wytworzeniem zbiornika „J” z jelita końcowego z wytworzeniem czasowej pętlowej ileostomii[78]. Zmieniają się z kolei techniki operacyjne i coraz więcej ośrodków wykonuje tę procedurę metodami laparoskopowymi[192-195]. Na rodzaj zabiegu może mieć wpływ tryb przeprowadzanej operacji i stan ogólny pacjenta. Mimo wcześniejszych obaw, również u ludzi starszych zbiornik jelitowy jest dobrze tolerowany i pacjenci ci nie powinni być dyskwalifikowani od proktokolektomii odtwórczej tylko ze względu na wiek[196-198]. U chorych z ciężkim rzutem choroby, wyniszczonych, w złym stanie ogólnym rekomenduje się wieloetapowe leczenie chirurgiczne (kolektomia, wytworzenie zbiornika, zamknięcie ileostomii protekcyjnej)[79-81].

W badanej grupie wszyscy pacjenci byli leczeni chirurgicznie. U 99 wykonano klasyczną proktokolektomię odtwórczą z wytworzeniem zbiornika „J” i protekcyjną ileostomią. U jednego pacjenta, będącego w złym stanie ogólnym, wykonano proktokolektomię z wytworzeniem ileostomii końcowej. 99 pacjentów było operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej, jeden – 8-letnie dziecko, w Klinice Chirurgii Dziecięcej, ale przez ten sam zespół z Kliniki Chirurgii Kolorektalnej.

Znaczna większość pacjentów z badanej grupy chorych – 67 % – operowana była ze wskazań wybiórczych. Głównymi wskazaniami wybiórczymi był długoletni przebieg choroby, stopniowo wyniszczający pacjenta i niereagujący na leczenie zachowawcze. U części były to również

powikłania pozajelitowe ze zgorzelinowym zapaleniem skóry na czole oraz podejrzenie przemiany nowotworowej w badaniach endoskopowych. Drugą grupę stanowiły wskazania pilne i nagłe do zabiegu operacyjnego. Większość z nich to pacjenci przyjmowani bezpośrednio w ramach ostrego dyżuru ze Szpitalnego Oddziału Ratunkowego lub kierowani z innych oddziałów lub szpitali. Odsetek ciężkich przypadków w badanej grupie wymagających natychmiastowego lub pilnego leczenia operacyjnego nie odzwierciedla obrazu całej populacji z racji charakteru Kliniki Chirurgii Kolorektalnej jako ośrodka referencyjnego. Wskazaniami pilnymi do leczenia operacyjnego były ostre rzuty choroby i brak poprawy po wdrażanym leczeniu, z kolei wskazaniami nagłymi były toksyczne rozdęcia jelita, masywne krwawienie oraz wstrząs septyczny i gwałtowne pogorszenie się stanu chorego.

Znamienna jest też różnica w długości okresu między rozpoznaniem a operacją u pacjentów ze wskazaniami wybiórczymi oraz u pacjentów ze wskazaniem pilnym lub nagłym. U pacjentów ze wskazaniami wybiórczymi okres ten wynosił średnio 8,6 roku, co koreluje z 8-10 letnim czasem trwania choroby podawanym w literaturze, po którym ryzyko chociażby nowotworzeni znacznie wzrasta. Krótki, nieco ponad roczny okres od rozpoznania CU a operacją we wskazaniach nagłych i pilnych jest z kolei charakterystyczny dla Kliniki jako ośrodka referencyjnego, do którego z innych ośrodków w trybie ostrym trafiają wyselekcjonowani pacjenci, najczęściej w bardzo ciężkim stanie, niepoddający się leczeniu zachowawczemu i wymagający szybkiej decyzji o wdrożeniu leczenia operacyjnego.

W badaniach molekularnych przeprowadzono analizę częstości występowania wariantów c.3020insC, c.802C>T, c.2104C>T, c.2722G>C w genie *NOD2*. Powyższe warianty polimorficzne tego genu analizowano w niniejszej pracy, ponieważ związane są z podwyższonym ryzykiem występowania choroby Crohna, dlatego ewentualny udział tego genu w modyfikacji przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wymagał weryfikacji.

Częstości alleli w badanych locus porównywano z grupą kontrolną 154 osób losowo dobranych z populacji. Dodatkowo zwrócono uwagę na częstości polimorfizmów u pacjentów według wskazań do operacji. Grupy te po takim podziale nie były już duże. W przypadku wariantów c.3020insC, c.2104C>T, c.2722G>C zgodnie z danymi literaturowymi nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ich występowaniu w grupie pacjentów i grupie kontrolnej[103]. Ich częstości zarówno w grupie kontrolnej, jak i w przypadku porównań częstości w grupach pacjentów z różnymi wskazaniami do operacji różniły się bardzo nieznacznie.

Badanie wariantu c.802C>T genu *NOD2* przyniosło zupełnie inne wyniki. Częstość tego polimorfizmu była zróżnicowana w badanych grupach. Różnice w częstościach alleli były statystycznie istotne. W grupie pacjentów obserwowano statystycznie istotną niższą częstość występowania allela T. Allel dziki i genotypy z nim związane występowały statystycznie istotnie

częściej (Tabela 19 i 20). Badanie tego polimorfizmu było już wykonywane w innych ośrodkach u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Uzyskane tam wyniki wykazywały podwyższoną częstość występowania tego polimorfizmu w porównaniu do grupy kontrolnej, ale była ona niższa niż w grupie chorych z chorobą Crohna.

Badania z udziałem polskich chorych z zapaleniem błony śluzowej żołądka wykazywały podwyższoną częstość allela T, z czego autorzy konkludowali, że polimorfizm ten, zmieniający aminokwas, może mieć wpływ na budowę nabłonka żołądka i podwyższa ryzyko jego nowotworu[199]. W badaniach tego wariantu u osób urodzonych w północnych Indiach zaobserwowano podwyższoną częstość genotypu TT u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, jednak była ona niższa niż u chorych z chorobą Crohna[104].

W badanej grupie chorych obserwujemy zwiększoną częstość występowania genotypu CC, który jest genotypem dzikim.

W dalszych badaniach analizowano częstości występowania wariantów c.1-207G>C i c.1507C>T genów *SLC22A5* i *SLC22A4*. Związek wariantów tych genów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jest znany[118, 200-203]. W badaniach własnych odnotowaliśmy zwiększoną częstość występowania alleli zmutowanych niż opisana w innych grupach nieselekcjonowanych pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego[204-206]. W naszej grupie częstość allela T była w locus c.1507C>T wyższa o 9%, w nieselekcjonowanej grupie z Węgier różnica ta wynosiła 0,3%[118]. Podobnie w przypadku wariantu c.1-207G>C w naszej grupie różnica częstości wynosiła 10%, a w populacji węgierskiej niecałe 3%[118]. Obserwowany u naszych pacjentów wzrost częstości alleli zmutowanych jest statystycznie istotnie częstszy niż w grupie kontrolnej. Może to świadczyć o silnym związku alleli loci c.1507C>T i c.1-207G>C z występowaniem choroby, zwłaszcza z jej cięższym przebiegiem.

W innych badaniach chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego obserwuje się podwyższoną częstość haplotypów TC w obu loci, jednak nie ma istotnie podwyższonych częstości alleli lub genotypów w tych loci[207]. W grupie chorych badanych w ramach niniejszej rozprawy zaobserwowano statystycznie istotną różną częstość genotypów polimorfizmu c.1507C>T w porównaniu z grupą kontrolną (Tab.21). Dodatkowo zaobserwowano, że różnice w częstości genotypów tego polimorfizmu są obserwowane także w podgrupach pacjentów operowanych zarówno ze wskazań wybiórczych jak i pilnych. W przypadku obu loci obserwuje się podwyższoną częstość występowania wariantów polimorficznych w grupie pacjentów operowanych ze wskazań nagłych. Częstości alleli w tych grupach rozkładają się w ten sposób, że częstość ich w grupie pacjentów operowanej ze wskazań wybiórczych jest niższa niż średnia, a w grupie operowanej ze wskazań pilnych wyższa. Można zauważyć tendencję dowodzącą, że

występowanie wariantów polimorficznych w tych loci predysponuje do ostrzejszego przebiegu choroby.

Przebadano również status genu *HPGD* kodującego dehydrogenazę prostaglandyny. W badanej grupie nie wykryto mutacji prowadzących do zmian sekwencji aminokwasów produktu białkowego genu. Wykryto dwa polimorfizmy i zostały one przebadane pod względem częstości występowania w badanych grupach. W literaturze nie ma opracowań dotyczących polimorfizmów c.421+39G>C i c.168G>A w genie *HPGD* w kontekście chorób zapalnych jelit. W naszej grupie obserwujemy podwyższoną o kilka procent częstość występowania tych alleli w stosunku do grupy kontrolnej. Nie odnotowano jednak istotności statystycznej tych różnic. Zaobserwowano również zróżnicowanie częstości występowania alleli w grupie pacjentów podzielonych pod względem wskazań do wykonania zabiegu operacyjnego. Częstość allela polimorficznego A w c.168G>A jest statystycznie istotnie wyższa w grupie pacjentów operowanych ze wskazań wybiórczych w porównaniu do grupy kontrolnej.

Jak zaznaczono wyżej w przypadku wariantów *SLC22A5* i *SLC22A4*, większą częstość wariantów polimorficznych odnotowano w grupie operowanych ze wskazań pilnych. Nieznany jest wpływ tych polimorfizmów na funkcje genu. Substytucja c.168G>A nie zmienia sekwencji aminokwasów, w 56 kodonie tryplet CAA jest zamieniony na CAG i jest to substytucja niema. Niewykluczone, że ta substytucja może być związana ze zmianą poziomu ekspresji genu *HPGD*, jednak takich badań nie przeprowadzono.

## VI. WNIOSKI

Badana grupa jest grupą selekcionowaną z populacji chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i została scharakteryzowana pod względem klinicznym i genetycznym, co pozwala na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Rozpoznanie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego postawione powyżej piątej dekady życia związane jest w badanej grupie z ostrym i ciężkim przebiegiem choroby wymagającym interwencji chirurgicznej w krótkim czasie od zdiagnozowania choroby.
2. Polimorfizmy c.3020insC, c.2104C>T, c.2722G>C w genie *NOD2* nie wpływają na przebieg choroby.
3. Allel dziki polimorfizmu c.802C>T jest związany z cięższym przebiegiem choroby.
4. Nosicielstwo wariantów polimorficznych c.1-207G>C, c.1507C>T genów *SLC22A5* i *SLC22A4* związane jest z cięższym i ostrzejszym przebiegiem choroby i ich częstość różni się od nieselekcjonowanej grupy.
5. Polimorfizmy c.421+39G>C i c.168G>A w genie *HPGD* wykazują związek z ciężkim przebiegiem choroby.

## VII. STRESZCZENIE

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest jednostką zaliczaną do nieswoistych zapaleń jelit. Jest to rozlany proces zapalny obejmujący błonę śluzową jelita grubego. Najczęściej występuje u ludzi młodych, w wieku 20-40 lat, bez wyraźnej przewagi którejkolwiek z płci. Dotychczas nie został poznany jednoznaczny czynnik rozwoju tej choroby. Przyjmuje się, że w patogenezie wszystkich nieswoistych zapaleń jelit bierze udział czynnik genetyczny, środowiskowy i immunologiczny. Przebieg choroby jest bardzo zmienny. Szacuje się, że 20% chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego będzie wymagało leczenia operacyjnego.

Celem pracy było scharakteryzowanie grupy chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej pod względem klinicznym i genetycznym. Pacjenci byli charakteryzowani na podstawie zebranych danych klinicznych, badania podmiotowego, przedmiotowego oraz dostępnych badań dodatkowych. Wykonano badania molekularne wybranych wariantów polimorficznych genów *NOD2*, *SLC22A4* i *SLC22A5*. Dodatkowo wykonano analizę molekularną genu *HPDH* i oceniono udział obserwowanych polimorfizmów w warunkowaniu występowania choroby o ciężkim przebiegu, wymagającej leczenia operacyjnego.

Grupę badaną stanowiło stu pacjentów leczonych chirurgicznie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej w latach 2007-2011. Grupę tę stanowili pacjenci przyjęci do szpitala w trybie ostrym oraz pacjenci przyjmowani bez ciężkiego rzutu CU, kwalifikowani do operacji ze wskazań wybiórczych. Od każdego pacjenta zakwalifikowanego do badania została pobrana krew do badań genetycznych. Analiza molekularna wykonywana była w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, a grupę kontrolną stanowiła 154 osobowa grupa chorych losowo wybranych z populacji polskiej.

W badanej grupie było 41 kobiet i 59 mężczyzn, a średni wiek pacjenta, u którego zdiagnozowano chorobę, wynosił 35 lat. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w średnim wieku postawienia diagnozy u kobiet i u mężczyzn. Leczenie operacyjne było wdrożone średnio po 6 latach trwania choroby zarówno u mężczyzn, jak i kobiet. Również średni wiek pacjenta, u którego przeprowadzono operację, był podobny (odpowiednio 41 dla kobiet i 45 dla mężczyzn).

Większość (90%) operowanych było klasyfikowanych jako E3 w ocenie rozległości zmian w skali montrealskiej. Ponad połowa chorych w ocenie ciężkości rzutu choroby oceniono jako umiarkowany (S2 w skali montrealskiej). Cecha ta była bezpośrednio uzależniona od trybu wdrażanego postępowania chirurgicznego, wybiórczego czy pilnego/nagłego. Podobną zależność stwierdzono przy ocenie współczynnika aktywności choroby DAI. Średnia wartość punktowa operowanego pacjenta wyniosła 8.9 punktów, ale zaobserwowano również dwa szczyty punktowe: 7 punktów (w większości



pacjenci ze wskazaniami wybiórczymi do operacji) oraz 10-11 punktów (głównie pacjenci ze wskazaniami pilnymi do leczenia operacyjnego).

Powikłana pozajelitowa stwierdzono u 11% pacjentów, obejmujące głównie zeszywniające zapalenia stawów kręgosłupa i zgorzelinowe ropne zapalenia skóry (po 3 pacjentów). Nowotwory stwierdzono u 5 pacjentów, w tym u jednego chorego rozpoznano raka synchronicznego.

Zabieg operacyjny – w 99% przypadków proktokolektomia odtwórcza z wytworzeniem zbiornika „J” z jelita krętego oraz wyłonieniem protekcyjnej pętlowej ileostomii – wykonano w 67% ze wskazań wybiórczych. Okres pomiędzy rozpoznaniem a operacją był istotnie dłuższy u tych pacjentów (średnio 8,6 lat) w porównaniu z pacjentami kwalifikowanymi do leczenia chirurgicznego ze wskazań pilnych i nagłych (odpowiednio 1 i 1,5 roku).

Badaną grupę scharakteryzowano pod względem genetycznym. W badaniach molekularnych przeprowadzono analizę częstości występowania wariantów polimorficznych c.3020insC, c.802C>T, c.2104C>T, c.2722G>C w genie *NOD2*; wariantów c.1-207G>C, c.1507C>T genów *SLC22A5* i *SLC22A4* oraz genu *HPGD*.

Wykluczono udział c.3020insC, c.2104C>T, c.2722G>C w genie *NOD2* w modyfikowaniu przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. W przypadku c.802C>T genu *NOD2* w grupie pacjentów odnotowano statystycznie istotną podwyższoną częstość występowania allela dzikiego.

Warianty polimorficzne c.1-207G>C, c.1507C>T genów *SLC22A5* i *SLC22A4* związane są z cięższym, ostrzejszym przebiegiem choroby. W badanej grupie zaobserwowano statystycznie istotnie większą częstość występowania tych wariantów, a w grupie operowanych w trybie pilnym była ona jeszcze większa.

W badaniach nie wykryto mutacji prowadzących do zmiany sekwencji aminokwasów produktu białkowego genu *HPGD*, a jeden z wykrytych polimorfizmów c.168G>A występował statystycznie istotnie częściej w grupie chorych operowanych ze wskazań wybiórczych, natomiast polimorfizm c.421+39C>T występował statystycznie istotnie częściej w całej grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną.

## VII. SUMMARY

Ulcerative colitis (UC) is one of disease entities representing inflammatory bowel disease (IBD). This is a diffuse inflammatory process affecting the mucosa of the large bowel. UC usually occurs in young people with the onset most commonly seen between the ages 20 and 40. Both sexes are equally affected.

The etiology of IBD is still unknown, although genetic, environmental and immunologic factors are taken into account. The natural course of UC is characterized by remissions and exacerbations. It is estimated that around 20% of patients suffering from UC will require surgery.

The aim of this study was to characterize a group of UC patients treated surgically in Department of General and Colorectal Surgery of Poznan University of Medical Sciences. In each patient a detailed history was taken and laboratory studies were performed together with the genetic evaluation of a possible presence of *NOD2*, *SLC22A4*, *SLC22A5* and *HPDH* genes variants. The final aim of the research was to find the possible correlation between the genetic status of analyzed genes and severity of ulcerative colitis.

The studied group consisted of 100 UC patients: 41 females and 59 males, treated surgically in the years 2007-2011. These patients were qualified for surgery on an emergent and elective basis. They were divided into subgroups according to the Montreal classification. A disease activity index (DAI) was assessed in each patient as well as a blood sample was taken and sent for a molecular analysis to the Institute of Human genetics of Polish Academy of Sciences in Poznań. The control group consisted of 154 people chosen at random from the Polish population.

The average age of diagnoses was 35 in both sexes. Surgical treatment was on average implemented 6 years later. The average age of a patient undergoing surgery was adequately 41,26 for females and 44,55 for males. According to the clinical data, 90% of patients undergoing laparotomy were classified as E3 in the Montreal classification and over 50% as S2 meaning a moderate course of disease. Correlation between severity, disease activity index (DAI) and urgency of qualification for surgery was found. The average DAI was 8.9 points. DAI of 7 was estimated in patients electively qualified for surgery. Patients with DAI reaching 10-11 points were usually qualified for laparotomy on an emergent basis.

Extraintestinal symptoms were manifested by 11% of patients comprising mainly ankylosing spondylitis observed in 3 patients and pyoderma gangrenosa found also in 3 patients. Adenocarcinoma was diagnosed in 3 patients. One of them presented 2 synchronous foci of malignancy.

In 99% of cases restorative proctocolectomy with 'J' pouch ileoanal anastomosis and temporary loop ileostomy was performed. The period

between the diagnoses and surgery was substantially longer – the average of 8,6 years in electively qualified patients than in emergent ones 1,5%.

The studied group was genetically characterized. In molecular studies analysis of frequency of the following gene variants was evaluated: c.3020insC, c.802C>T c.2104C>T, c.2722G>C in *NOD2*; c.1-207G>C, c.1507C>T in *SLCC22A5* and *SLCC22A4* and gene *HPGD*. The presence of c.3020insC, c.2104C>T, c.2722G>C in *NOD2* did not correlate with severity of ulcerative colitis. In case of c.802C>T variant of gene *NOD2* a statistically significant higher frequency of a wild allele presence was found. The following polymorphic variants c.1-207G>C, c.1507C>T of genes *SLC22A5* and *SLC22A4* correlate with the more severe course of UC.

In our studies no mutations leading to the change in aminoacid sequence of the HPGD gene protein product were found. One of the identified c.168G>A polymorphisms occurred statistically more frequent in a group of patients operated on an elective basis. In turn, c.421+39C>T polymorphism was observed statistically more frequent in the UC patients group than the control one.

## IX. WYKAZ TABEL I RYCIN

### Tabele

1. Montrealska klasyfikacja wrzodziejącego zapalenia jelita grubego w zależności od rozległości zmian w jelicie
2. Montrealska klasyfikacja wrzodziejącego zapalenia jelita grubego w zależności od ciężkości rzutu choroby
3. Indeks aktywności choroby (DAI Score)
4. Wskazania do operacyjnego leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego
5. Warunki amplifikacji fragmentów genów badanych w ramach rozprawy
6. Mieszanina reakcyjna do amplifikacji fragmentów DNA
7. Warunki reakcji PCR
8. Enzymy restrykcyjne stosowane w identyfikacji badanych polimorfizmów genu *NOD2* oraz wielkości produktów trawienia związane z odpowiednimi genotypami
9. Mieszanina reakcyjna do amplifikacji fragmentów DNA do analizy HRMA
10. Warunki reakcji PCR dla analizy HRM
11. Skład mieszaniny reakcyjnej
12. Warunki reakcji sekwencjonowania
13. Charakterystyka populacyjna badanej grupy
14. Leczenie operacyjne w korelacji z wiekiem pacjenta i wiekiem postawienia diagnozy
15. Częstość zachorowania w poszczególnych dekadach życia z uwzględnieniem płci oraz czasu od postawienia diagnozy choroby do zabiegu operacyjnego
16. Klasyfikacja montrealska badanej grupy chorych
17. DAI Score badanej grupy chorych przy kwalifikacji do zabiegu
18. Zestawienie grup pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego
19. Częstości genotypów obserwowanych w genie *NOD2*
20. Częstości alleli obserwowanych w genie *NOD2*
21. Częstości genotypów obserwowanych w genach *SLC22A5* i *SLC22A4*
22. Częstości genotypów obserwowanych w genach *SLC22A5* i *SLC22A4*
23. Częstości genotypów w genie *HPGD*
24. Częstości genotypów w genie *HPGD*

## Ryciny

1. Obraz endoskopowy ciężkiego rzutu CU
2. Pacjent z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa
3. Schemat zbiornika jelitowego wytworzonego metodą staplerową z dystalnego odcinka jelita krętego oraz zespolenia zbiornikowo-jelitowego
4. Obraz błony śluzowej jelita grubego w ciężkim rzucie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – preparat pooperacyjny
5. Procentowy rozkład zachorowań wg płci w poszczególnych dekadach życia
6. Okres od postawienia diagnozy do operacji w zależności od dekady życia pacjenta, w której diagnoza została postawiona
7. Procentowy odsetek poszczególnych wskazań do leczenia operacyjnego
8. Okresy od postawienia diagnozy CU do zabiegu operacyjnego w latach
9. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.3020insC
10. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC w badanej grupie pacjentów
11. Wykresy szybkości topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC
12. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej od próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.3020insC
13. Analiza PCR-SSCP dla fragmentu genu *NOD2* obejmującego c.3020insC
14. Częstości genotypów C.3020insC w badanych grupach
15. Częstość występowania insercji C.3020insC w badanych grupach
16. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.802C>T w badanej grupie pacjentów
17. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T w badanej grupie pacjentów
18. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T w badanej grupie pacjentów
19. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.802C>T
20. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.802C>T w genie *NOD2*
21. Częstości genotypów polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
22. Częstości alleli polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
23. Częstości alleli polimorfizmu c.802C>T w genie *NOD2* obserwowanych w badanej grupie, z uwzględnieniem wskazań do operacji

24. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.2722G>C w badanej grupie chorych
25. Profile topnienia w badanej grupie pacjentów fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych
26. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych
27. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2722G>C w badanej grupie chorych
28. Zestawienie częstości genotypów c.2722G>C w genie *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
29. Częstości alleli w c.2722G>C obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
30. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *NOD2* zawierającego c.2104C>T w badanej grupie chorych
31. Profile topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T w badanej grupie pacjentów
32. Krzywe topnienia fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T w badanej grupie pacjentów
33. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentów genu *NOD2* obejmujących miejsce występowania c.2104C>T
34. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.2104C>T genu *NOD2* w grupie chorych
35. Częstości genotypów c.2104C>T genu *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
36. Zestawienie częstości alleli wariantu c.2104C>T genu *NOD2* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
37. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G/C w badanej grupie pacjentów
38. Profile topnienia fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G/C w badanej grupie pacjentów
39. Krzywe topnienia fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G/C w badanej grupie pacjentów
40. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego fragmentu genu *SLC22A5* zawierającego c.1-207G/C w badanej grupie
41. Zestawienie częstości genotypów c.1-207G>C w genie *SLC22A5* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
42. Rozkład częstości genotypów wariantu c.1-207G/C w genie *SLC22A5* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego

43. Częstości alleli wariantu c.1-207G/C w genie *SLC22A5* obserwowanych w grupie badanych chorych i grupie kontrolnej
44. Częstości alleli wariantu c.1-207G/C w genie *SLC22A5* obserwowanych w badanej grupie z uwzględnieniem wskazania do zabiegu operacyjnego
45. Przyrost produktów w reakcji amplifikacji fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1672C/T w badanej grupie pacjentów
46. Profile topnienia fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1672C/T w badanej grupie
47. Różnicowanie krzywych topnienia względem krzywej z próbki typu dzikiego (C/C) fragmentu genu *SLC22A4* zawierającego c.1672C>T
48. Analiza restrykcyjna wykrywania wariantu c.1672C>T w grupie chorych
49. Zestawienie częstości genotypów c.1672C>T w genie *SLC22A4* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
50. Rozkład częstości genotypów c.1672C>T w genie *SLC22A4* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego
51. Zestawienie częstości alleli wariantu c.1672C>T w genie *SLC22A4* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
52. Rozkład częstości alleli c.1672C>T w genie *SLC22A4* w badanych grupach z uwzględnieniem podziału grupy pacjentów wg wskazań do zabiegu operacyjnego
53. Analiza PCR-SSCP eksonu 2 genu *HPGD* grupie pacjentów
54. Analiza PCR-SSCP eksonu 2 genu *HPGD* grupie pacjentów
55. Analiza sekwencji eksonu 2 genu *HPGD*
56. Częstości genotypów wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
57. Częstości genotypów wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w badanej grupie z uwzględnieniem wskazań do zabiegu operacyjnego
58. Częstości alleli wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
59. Częstości alleli wariantu c.168G>A w genie *HPGD* obserwowanych w badanych grupach z uwzględnieniem wskazań do zabiegu operacyjnego
60. Analiza PCR-HD eksonów 2 i 3 genu *HPGD* grupie pacjentów
61. Analiza PCR-SSCP eksonu 4 genu *HPGD* grupie pacjentów
62. Analiza PCR-SSCP eksonu 4 genu *HPGD* grupie kontrolnej
63. Częstości genotypów wariantu c.421+39C>T w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
64. Częstości alleli wariantu c.421+39C>T w genie *HPGD* obserwowanych w grupie chorych i grupie kontrolnej
65. Analiza PCR-SSCP eksonu 5 genu *HPGD* w grupie pacjentów
66. Analiza PCR-HD eksonów 6 i 7 genu *HPGD* grupie pacjentów
67. Analiza PCR-SSCP eksonu 7 genu *HPGD* grupie pacjentów

## X. PIŚMIENNICTWO

1. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP: **Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease**. *Gut* 1996, **38**(5):738-741.
2. Fiocchi C: **Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis**. *Gastroenterology* 1998, **115**(1):182-205.
3. Hume G, Radford-Smith GL: **The pathogenesis of Crohn's disease in the 21st century**. *Pathology* 2002, **34**(6):561-567.
4. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB *et al*: **Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci**. *Am J Hum Genet* 2000, **66**(6):1863-1870.
5. Mathew CG, Lewis CM: **Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects**. *Hum Mol Genet* 2004, **13 Spec No 1**:R161-168.
6. Young C, Allen MH, Cuthbert A, Ameen M, Veal C, Leman J, Burden AD, Kirby B, Griffiths CE, Trembath RC *et al*: **A Crohn's disease-associated insertion polymorphism (3020insC) in the NOD2 gene is not associated with psoriasis vulgaris, palmo-plantar pustular psoriasis or guttate psoriasis**. *Exp Dermatol* 2003, **12**(4):506-509.
7. King K, Sheikh MF, Cuthbert AP, Fisher SA, Onnie CM, Mirza MM, Pattni RC, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J *et al*: **Mutation, selection, and evolution of the Crohn disease susceptibility gene CARD15**. *Human mutation* 2006, **27**(1):44-54.
8. Mimouna S, Goncalves D, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Hofman P, Vouret-Craviari V: **Crohn disease-associated Escherichia coli promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses**. *Gut microbes* 2011, **2**(6):335-346.
9. Schroder O, Stein J: **[Escherichia coli in Crohn dis: pathogenesis or commensal organism?]**. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 1999, **37**(5):469-471.
10. Andoh A, Ogawa A, Bamba S, Fujiyama Y: **Interaction between interleukin-17-producing CD4+ T cells and colonic subepithelial myofibroblasts: what are they doing in mucosal inflammation?** *Journal of gastroenterology* 2007, **42 Suppl 17**:29-33.
11. Ye MB, Lim BO: **Dietary Pectin Regulates the Levels of Inflammatory Cytokines and Immunoglobulins in Interleukin-10 Knockout Mice**. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010.
12. Kugathasan S, Werlin SL: **Measurement of pANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies) and ASCA (anti-saccharomyces cerevisiae) in screening for IBD in young children**. *Inflammatory bowel diseases* 1999, **5**(4):283-284.
13. Maunder RG, Greenberg GR, Hunter JJ, Lancee WJ, Steinhart AH, Silverberg MS: **Psychobiological subtypes of ulcerative colitis: pANCA status moderates the relationship between disease activity and psychological distress**. *The American journal of gastroenterology* 2006, **101**(11):2546-2551.
14. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A: **Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype**. *The American journal of gastroenterology* 2004, **99**(11):2235-2241.
15. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuisink ZM, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H, von Blomberg BM, Meuwissen SG: **Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods**. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2002, **14**(9):1013-1018.
16. McGovern D, Powrie F: **The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD**. *Gut* 2007, **56**(10):1333-1336.
17. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A *et al*: **A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene**. *Science* 2006, **314**(5804):1461-1463.
18. Bartnik W: **Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit**. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2007, **2**(5):215-229.
19. Herrinton LJ, Liu L, Levin TR, Allison JE, Lewis JD, Velayos F: **Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010**. *Gastroenterology* 2012, **143**(2):382-389.
20. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW *et al*: **Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review**. *Gastroenterology* 2012, **142**(1):46-54 e42; quiz e30.



21. Romberg-Camps MJ, Hesselink-van de Kruijs MA, Schouten LJ, Dagnelie PC, Limonard CB, Kester AD, Bos LP, Goedhard J, Hameeteman WH, Wolters FL *et al*: **Inflammatory Bowel Disease in South Limburg (the Netherlands) 1991-2002: Incidence, diagnostic delay, and seasonal variations in onset of symptoms.** *Journal of Crohn's & colitis* 2009, **3**(2):115-124.
22. Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S: **Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review.** *The American journal of gastroenterology* 2009, **104**(8):2100-2109.
23. Birrenbach T, Bocker U: **Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications.** *Inflammatory bowel diseases* 2004, **10**(6):848-859.
24. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S: **Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis.** *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 2006, **81**(11):1462-1471.
25. Rudra T, Motley R, Rhodes J: **Does smoking improve colitis?** *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 1989, **170**:61-63; discussion 66-68.
26. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP: **Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis.** *Gut* 2002, **51**(6):803-807.
27. Frisch M, Johansen C, Mellekjaer L, Engels EA, Gridley G, Biggar RJ, Olsen JH: **Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases.** *Surgery* 2001, **130**(1):36-43.
28. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA: **Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review.** *Inflammatory bowel diseases* 2002, **8**(4):277-286.
29. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin TH: **Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease.** *Gut* 2002, **51**(6):808-813.
30. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G: **Appendectomy protects against ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 1994, **106**(5):1251-1253.
31. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF: **The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications.** *Gut* 2006, **55**(6):749-753.
32. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K *et al*: **Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology.** *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 2005, **19 Suppl A**:5-36.
33. Travis SP, Farrant JM, Ricketts C, Nolan DJ, Mortensen NM, Kettlewell MG, Jewell DP: **Predicting outcome in severe ulcerative colitis.** *Gut* 1996, **38**(6):905-910.
34. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Flejou JF, Herfarth H, Hommes DW *et al*: **European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis.** *Journal of Crohn's & colitis* 2008, **2**(1):1-23.
35. Collins P, Rhodes J: **Ulcerative colitis: diagnosis and management.** *BMJ* 2006, **333**(7563):340-343.
36. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW: **Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis.** *Gut* 1988, **29**(3):342-345.
37. Rubin DC, Shaker A, Levin MS: **Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer.** *Frontiers in immunology* 2012, **3**:107.
38. Torres J, Billioud V, Sachar DB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF: **Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence.** *Inflammatory bowel diseases* 2012, **18**(7):1356-1363.
39. Munchar J, Rahman HA, Zawawi MM: **Localized giant pseudopolyposis in ulcerative colitis.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 2001, **13**(11):1385-1387.
40. Ooi BS, Tjandra JJ, Pedersen JS, Bhathal PS: **Giant pseudopolyposis in inflammatory bowel disease.** *The Australian and New Zealand journal of surgery* 2000, **70**(5):389-393.
41. Marks RD, Roberts-Thomson IC: **Gastrointestinal: colonic pseudopolyposis.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2000, **15**(2):213.
42. Di Sabatino A, Giuffrida P, Corazza GR: **From impending toxic megacolon to multiple organ failure in severe ulcerative colitis.** *Internal and emergency medicine* 2013, **8**(2):185-186.
43. Aoki T, Kataoka M, Sou Y, Naitou S, Takeuchi M, Tsuji Y, Harada A, Sugimoto H, Hayama Y, Yamamoto K *et al*: **A case of pseudomembranous colitis concomitant with toxic megacolon and paralytic ileus.** *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastro-enterology* 2012, **109**(8):1386-1393.
44. Strong SA: **Management of acute colitis and toxic megacolon.** *Clinics in colon and rectal surgery* 2010, **23**(4):274-284.

45. Griniatsos J, Dimitriou N, Tyrizis S, Pappas P, Sougioultzis S, Stravodimos K: **Toxic megacolon due to fulminant Clostridium Difficile colitis**. *Acta gastro-enterologica Belgica* 2011, **74**(2):359-360.
46. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: **Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study**. *The New England journal of medicine* 1990, **323**(18):1228-1233.
47. Katsanos KH, Vermeire S, Christodoulou DK, Riis L, Wolters F, Odes S, Freitas J, Hoie O, Beltrami M, Fornaciari G *et al*: **Dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease 10 years after diagnosis: results of a population-based European collaborative follow-up study**. *Digestion* 2007, **75**(2-3):113-121.
48. Dorofeyev AE, Vasilenko IV, Rassokhina OA: **Joint extraintestinal manifestations in ulcerative colitis**. *Dig Dis* 2009, **27**(4):502-510.
49. Andreyev HJ, Kamm MA, Forbes A, Nicholls RJ: **Joint symptoms after restorative proctocolectomy in ulcerative colitis and familial polyposis coli**. *Journal of clinical gastroenterology* 1996, **23**(1):35-39.
50. van Zitteren LM, Bovenschen HJ, Tjon ATWE: **Ulcerative skin lesions in a child with colitis ulcerosa after colectomy**. *BMJ case reports* 2011, **2011**.
51. Ahmed I, Koulaouzidis A, Iqbal J, Wardle T: **Metastasis of ulcerative colitis in peristomal skin--an extremely rare case**. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* 2009, **18**(2):257.
52. Barling B: **Idiopathic ulcerative colitis with severe ulceration of the skin and peritonitis**. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1949, **42**(2):105.
53. Carbonnel F, Lavergne A, Lemann M, Bitoun A, Valleur P, Hautefeuille P, Galian A, Modigliani R, Rambaud JC: **Colonoscopy of acute colitis. A safe and reliable tool for assessment of severity**. *Digestive diseases and sciences* 1994, **39**(7):1550-1557.
54. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Sauar J, Schulz T, Stray N, Vatn MH, Moum B: **Change of diagnosis during the first five years after onset of inflammatory bowel disease: results of a prospective follow-up study (the IBSEN Study)**. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2006, **41**(9):1037-1043.
55. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, Lemann M, Marteau P, Rutgeerts P, Scholmerich J *et al*: **A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis**. *Gastroenterology* 2007, **132**(2):763-786.
56. Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk E, Borgen L: **5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis**. *Gastroenterology* 1987, **92**(6):1894-1898.
57. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, D'Haens G, D'Hoore A, Mantzaris G, Novacek G *et al*: **Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management**. *Journal of Crohn's & colitis* 2012, **6**(10):991-1030.
58. Felley C, Mottet C, Hess J, Maillard MH, Delarive J, Michetti P: **[Main therapeutic advances in IBD in 2008]**. *Rev Med Suisse* 2009, **5**(187):185-186, 188-190, 192-184.
59. Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A: **Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat**. *British journal of pharmacology* 2000, **130**(8):1949-1959.
60. Vernia P, Cittadini M, Caprilli R, Torsoli A: **Topical treatment of refractory distal ulcerative colitis with 5-ASA and sodium butyrate**. *Digestive diseases and sciences* 1995, **40**(2):305-307.
61. Meyers S, Janowitz HD: **5-ASA for ulcerative colitis**. *The New England journal of medicine* 1988, **318**(24):1620-1621.
62. Cottone M, Renna S, Modesto I, Orlando A: **Is 5-ASA still the treatment of choice for ulcerative colitis?** *Current drug targets* 2011, **12**(10):1396-1405.
63. Marshall JK, Thabane M, Steinhart AH, Newman JR, Anand A, Irvine EJ: **Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis**. *Cochrane Database Syst Rev* 2010(1):CD004115.
64. Sutherland L, Macdonald JK: **Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis**. *Cochrane Database Syst Rev* 2006(2):CD000544.
65. Kruis W, Pohl C: **[Clinical effect of various 5-ASA preparations in ulcerative colitis]**. *Med Klin (Munich)* 1999, **94 Suppl 1**:26-30.
66. Dybdahl JH: **[Mesalazine (5-ASA) in ulcerative colitis]**. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 1990, **110**(24):3130-3131.
67. Kippen DL: **The role of adrenal steroids in ulcerative colitis**. *Winnipeg Clinic quarterly* 1962, **15**:121-133.
68. Ng SC, Plamondon S, Kamm MA, Hart AL, Al-Hassi HO, Guenther T, Stagg AJ, Knight SC: **Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis**. *Inflammatory bowel diseases* 2010, **16**(8):1286-1298.

69. Esteve M, Gisbert JP: **Severe ulcerative colitis: at what point should we define resistance to steroids?** *World journal of gastroenterology* : WJG 2008, **14**(36):5504-5507.
70. Van Assche G, D'Haens G, Noman M, Vermeire S, Hiele M, Asnong K, Arts J, D'Hoore A, Penninckx F, Rutgeerts P: **Randomized, double-blind comparison of 4 mg/kg versus 2 mg/kg intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 2003, **125**(4):1025-1031.
71. Van Assche G, Lewis JD, Lichtenstein GR, Loftus EV, Ouyang Q, Panes J, Siegel CA, Sandborn WJ, Travis SP, Colombel JF: **The London position statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organisation: safety.** *The American journal of gastroenterology* 2011, **106**(9):1594-1602; quiz 1593, 1603.
72. Danese S, Angelucci E, Malesci A, Caprilli R: **Biological agents for ulcerative colitis: hypes and hopes.** *Medicinal research reviews* 2008, **28**(2):201-218.
73. Sands BE: **Biological therapies for ulcerative colitis.** *Acta gastro-enterologica Belgica* 2001, **64**(2):205-209.
74. Patel H, Greenberg GR: **Antibiotic therapy for ulcerative colitis: time for reevaluation?** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(3):860-861.
75. Friedman G: **The role of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile colitis.** *Gastroenterology clinics of North America* 2012, **41**(4):763-779.
76. Hass R, Busche R, Luciano L, Reale E, Engelhardt WV: **Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig.** *Gastroenterology* 1997, **112**(3):875-881.
77. Arnell TD: **Surgical management of acute colitis and toxic megacolon.** *Clinics in colon and rectal surgery* 2004, **17**(1):71-74.
78. Richards DM, Hughes SA, Irving MH, Scott NA: **Patient quality of life after successful restorative proctocolectomy is normal.** *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2001, **3**(4):223-226.
79. Alves A, Panis Y, Bouhnik Y, Maylin V, Lavergne-Slove A, Valleur P: **Subtotal colectomy for severe acute colitis: a 20-year experience of a tertiary care center with an aggressive and early surgical policy.** *Journal of the American College of Surgeons* 2003, **197**(3):379-385.
80. Berg DF, Bahadursingh AM, Kaminski DL, Longo WE: **Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease.** *American journal of surgery* 2002, **184**(1):45-51.
81. Hyman NH, Cataldo P, Osler T: **Urgent subtotal colectomy for severe inflammatory bowel disease.** *Diseases of the colon and rectum* 2005, **48**(1):70-73.
82. Sandborn WJ: **Pouchitis following ileal pouch-anal anastomosis: definition, pathogenesis, and treatment.** *Gastroenterology* 1994, **107**(6):1856-1860.
83. Shen B, Fazio VW, Remzi FH, Delaney CP, Bennett AE, Achkar JP, Brzezinski A, Khandwala F, Liu W, Bambrick ML *et al*: **Comprehensive evaluation of inflammatory and noninflammatory sequelae of ileal pouch-anal anastomoses.** *The American journal of gastroenterology* 2005, **100**(1):93-101.
84. May RE: **Sexual dysfunction following rectal excision for ulcerative colitis.** *The British journal of surgery* 1966, **53**(1):29-30.
85. Berndtsson I, Oresland T: **Quality of life before and after proctocolectomy and IPAA in patients with ulcerative proctocolitis--a prospective study.** *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2003, **5**(2):173-179.
86. Hurst RD, Molinari M, Chung TP, Rubin M, Michelassi F: **Prospective study of the incidence, timing and treatment of pouchitis in 104 consecutive patients after restorative proctocolectomy.** *Arch Surg* 1996, **131**(5):497-500; discussion 501-492.
87. Shen B, Achkar JP, Lashner BA, Ormsby AH, Remzi FH, Bevins CL, Brzezinski A, Petras RE, Fazio VW: **Endoscopic and histologic evaluation together with symptom assessment are required to diagnose pouchitis.** *Gastroenterology* 2001, **121**(2):261-267.
88. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, Pemberton JH, Phillips SF: **Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: a Pouchitis Disease Activity Index.** *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 1994, **69**(5):409-415.
89. Schmidt CM, Lazenby AJ, Hendrickson RJ, Sitzmann JV: **Preoperative terminal ileal and colonic resection histopathology predicts risk of pouchitis in patients after ileoanal pull-through procedure.** *Annals of surgery* 1998, **227**(5):654-662; discussion 663-655.
90. Lohmuller JL, Pemberton JH, Dozois RR, Ilstrup D, van Heerden J: **Pouchitis and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis.** *Annals of surgery* 1990, **211**(5):622-627; discussion 627-629.

91. Achkar JP, Al-Haddad M, Lashner B, Remzi FH, Brzezinski A, Shen B, Khandwala F, Fazio V: **Differentiating risk factors for acute and chronic pouchitis.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2005, **3**(1):60-66.
92. Merrett MN, Mortensen N, Kettlewell M, Jewell DO: **Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis.** *Gut* 1996, **38**(3):362-364.
93. Das P, Smith JJ, Tekkis PP, Heriot AG, Antropoli M, John Nicholls R: **Quality of life after indefinite diversion/pouch excision in ileal pouch failure patients.** *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2007, **9**(8):718-724.
94. Sandborn W, McLeod R, Jewell D: **Pharmacotherapy for inducing and maintaining remission in pouchitis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2000(2):CD001176.
95. Shen B, Achkar JP, Lashner BA, Ormsby AH, Remzi FH, Brzezinski A, Bevins CL, Bambrick ML, Seidner DL, Fazio VW: **A randomized clinical trial of ciprofloxacin and metronidazole to treat acute pouchitis.** *Inflammatory bowel diseases* 2001, **7**(4):301-305.
96. Shen B, Fazio VW, Remzi FH, Bennett AE, Lopez R, Brzezinski A, Oikonomou I, Sherman KK, Lashner BA: **Combined ciprofloxacin and tinidazole therapy in the treatment of chronic refractory pouchitis.** *Diseases of the colon and rectum* 2007, **50**(4):498-508.
97. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M: **Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial.** *Gastroenterology* 2003, **124**(5):1202-1209.
98. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA: **Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis.** *Gut* 2004, **53**(1):108-114.
99. Shen B, Lashner BA, Bennett AE, Remzi FH, Brzezinski A, Achkar JP, Bast J, Bambrick ML, Fazio VW: **Treatment of rectal cuff inflammation (cuffitis) in patients with ulcerative colitis following restorative proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis.** *The American journal of gastroenterology* 2004, **99**(8):1527-1531.
100. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G: **Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(7):4812-4818.
101. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH *et al*: **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature* 2001, **411**(6837):603-606.
102. Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A *et al*: **CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**(1):74-83.
103. Pugazhendhi S, Santhanam S, Venkataraman J, Creveaux I, Ramakrishna BS: **NOD2 gene mutations associate weakly with ulcerative colitis but not with Crohn's disease in Indian patients with inflammatory bowel disease.** *Gene* 2013, **512**(2):309-313.
104. Juyal G, Amre D, Midha V, Sood A, Seidman E, Thelma BK: **Evidence of allelic heterogeneity for associations between the NOD2/CARD15 gene and ulcerative colitis among North Indians.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2007, **26**(10):1325-1332.
105. Andriulli A, Annese V, Latiano A, Palmieri O, Fortina P, Ardigzone S, Cottone M, D'Inca R, Riegler G: **The frame-shift mutation of the NOD2/CARD15 gene is significantly increased in ulcerative colitis: an \*IG-IBD study.** *Gastroenterology* 2004, **126**(2):625-627.
106. McGovern DP, Van Heel DA, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP: **Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**(6):1465-1466.
107. Pichaud F, Delage-Mourroux R, Pidoux E, Jullienne A, Rousseau-Merck MF: **Chromosomal localization of the type-I 15-PGDH gene to 4q34-q35.** *Human genetics* 1997, **99**(2):279-281.
108. Coggins KG, Latour A, Nguyen MS, Audoly L, Coffman TM, Koller BH: **Metabolism of PGE2 by prostaglandin dehydrogenase is essential for remodeling the ductus arteriosus.** *Nature medicine* 2002, **8**(2):91-92.
109. Ensor CM, Yang JY, Okita RT, Tai HH: **Cloning and sequence analysis of the cDNA for human placental NAD(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase.** *The Journal of biological chemistry* 1990, **265**(25):14888-14891.
110. Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J: **Molecular genetics of Crohn's disease.** *Curr Opin Genet Dev* 2004, **14**(3):264-270.

111. Jadhav A, Niesen FH, Schultz L, Oppermann U, Maloney DJ, Simeonov A: **Potent and selective inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD)**. In: *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD); 2010.
112. Torres R, Herrerias A, Serra-Pages M, Roca-Ferrer J, Pujols L, Marco A, Picado C, de Mora F: **An intranasal selective antisense oligonucleotide impairs lung cyclooxygenase-2 production and improves inflammation, but worsens airway function, in house dust mite sensitive mice**. *Respiratory research* 2008, **9**:72.
113. Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW: **Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(52):20979-20984.
114. Thill M, Becker S, Fischer D, Cordes T, Hornemann A, Diedrich K, Salehin D, Friedrich M: **Expression of prostaglandin metabolising enzymes COX-2 and 15-PGDH and VDR in human granulosa cells**. *Anticancer research* 2009, **29**(9):3611-3618.
115. Quidville V, Segond N, Lausson S, Frenkian M, Cohen R, Jullienne A: **15-Hydroxyprostaglandin-dehydrogenase is involved in anti-proliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs COX-1 inhibitors on a human medullary thyroid carcinoma cell line**. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2006, **81**(1-2):14-30.
116. Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K *et al*: **Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer**. *Carcinogenesis* 2008, **29**(6):1219-1227.
117. Silva PJ, Juengel JL, Rollyson MK, Niswender GD: **Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF(2alpha)**. *Biology of reproduction* 2000, **63**(5):1229-1236.
118. Magyari L, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L *et al*: **Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients**. *Pathology oncology research : POR* 2007, **13**(1):53-56.
119. Martini M, Ferrara AM, Giachelia M, Panieri E, Siminovitch K, Galeotti T, Larocca LM, Pani G: **Association of the OCTN1/1672T variant with increased risk for colorectal cancer in young individuals and ulcerative colitis patients**. *Inflammatory bowel diseases* 2012, **18**(3):439-448.
120. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D'Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, Saibeni S, Peyvandi F, Bossa F, Zagaria C *et al*: **Variants of OCTN1-2 cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis**. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006, **23**(4):497-506.
121. Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR, Bromfield G, Datta LW, Jani N, Kane SV, Rotter JI, Philip Schumm L, Hillary Steinhart A *et al*: **Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease**. *European journal of human genetics : EJHG* 2007, **15**(3):328-335.
122. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A: **Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2**. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(32):20378-20382.
123. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A: **Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1**. *FEBS letters* 1997, **419**(1):107-111.
124. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G *et al*: **Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease**. *Nature genetics* 2004, **36**(5):471-475.
125. Plawski A, Jura J, Slomski R: **Wykrywanie mutacji punktowych w genie supresorowym APC człowieka metodą heterodupleksów**. *Przykłady analiz DNA* 2001:80-89.
126. Plawski A, Podralska M, Slomski R: **Wykrywanie mutacji metoda heterodupleksów**. *Analiza DNA teoria i praktyka* 2008:202-208.
127. Cheng J, Yim OS, Low PS, Tay SK, Yap EP, Lai PS: **Detection of hemi/homozygotes through heteroduplex formation in high-resolution melting analysis**. *Analytical biochemistry* 2011, **410**(1):158-160.
128. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Western LM, Bartolo C, Moxley RT, Mendell JR: **Heteroduplex analysis of the dystrophin gene: application to point mutation and carrier detection**. *American journal of medical genetics* 1994, **50**(1):68-73.
129. Plawski A, Slomski R: **Bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR z zastosowaniem starterów znakowanych indodikabocyanino-(Cy5)-fosforoamidem**. *Przykłady analiz DNA* 2001:271-273.
130. Slomski R, Nuc K, Plawski A, Lipinski D, Wolko L: **Sekwencjonowanie DNA**. *Analiza DNA teoria i praktyka* 2008:429-434.

131. Slomski R, Nuc P, Nuc K, Plawski A, Lipinski D: **Sekwencjonowanie plazmidowego DNA metodą Sangera.** *Przykłady analiz DNA* 2001:258-266.
132. Slomski R, Plawski A: **Sekwencjonowanie DNA - elektroforeza kapilarna.** *Analiza DNA teoria i praktyka* 2008:429-434.
133. Slomski R, Plawski A, Jura J, Kalak R, Lipinski D: **Sekwencjonowanie produktów PCR metodą cykliczną.** *Przykłady analiz DNA* 2001:274-279.
134. Weinstock JV, Elliott DE: **Helminths and the IBD hygiene hypothesis.** *Inflammatory bowel diseases* 2009, **15**(1):128-133.
135. Mayberry JF: **Recent epidemiology of ulcerative colitis and Crohn's disease.** *International journal of colorectal disease* 1989, **4**(1):59-66.
136. Vahedi H, Merat S, Momtahan S, Olfati G, Kazzazi AS, Tabrizian T, Rashtak S, Khaleghnejad R, Khademi H, Malekzadeh F *et al*: **Epidemiologic characteristics of 500 patients with inflammatory bowel disease in Iran studied from 2004 through 2007.** *Archives of Iranian medicine* 2009, **12**(5):454-460.
137. Quezada SM, Cross RK: **Association of age at diagnosis and ulcerative colitis phenotype.** *Digestive diseases and sciences* 2012, **57**(9):2402-2407.
138. Aldhous MC, Drummond HE, Anderson N, Baneshi MR, Smith LA, Arnott ID, Satsangi J: **Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis.** *The American journal of gastroenterology* 2007, **102**(3):589-597.
139. Riegler G, Tartaglione MT, Carratu R, D'Inca R, Valpiani D, Russo MI, Papi C, Fiorentini MT, Ingrosso M, Andreoli A *et al*: **Age-related clinical severity at diagnosis in 1705 patients with ulcerative colitis: a study by GISC (Italian Colon-Rectum Study Group).** *Digestive diseases and sciences* 2000, **45**(3):462-465.
140. Barreiro-de Acosta M, Magro F, Carpio D, Lago P, Echarri A, Cotter J, Pereira S, Goncalves R, Lorenzo A, Carvalho L *et al*: **Ulcerative colitis in northern Portugal and Galicia in Spain.** *Inflammatory bowel diseases* 2010, **16**(7):1227-1238.
141. Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Hoie O, Cvancarova M, Bernklev T, Henriksen M, Sauar J, Vatn MH *et al*: **Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study).** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2009, **44**(4):431-440.
142. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M *et al*: **Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification.** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(6):1314-1321.
143. Randall J, Singh B, Warren BF, Travis SP, Mortensen NJ, George BD: **Delayed surgery for acute severe colitis is associated with increased risk of postoperative complications.** *The British journal of surgery* 2010, **97**(3):404-409.
144. Brown SR, Haboubi N, Hampton J, George B, Travis SP: **The management of acute severe colitis: ACPGBI position statement.** *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2008, **10 Suppl 3**:8-29.
145. Kornbluth A, Sachar DB: **Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee.** *The American journal of gastroenterology* 2004, **99**(7):1371-1385.
146. Seo M, Okada M, Yao T, Okabe N, Maeda K, Oh K: **Evaluation of disease activity in patients with moderately active ulcerative colitis: comparisons between a new activity index and Truelove and Witts' classification.** *The American journal of gastroenterology* 1995, **90**(10):1759-1763.
147. Nedelciuc O, Pintilie I, Dranga M, Mihai C, Prelipcean CC: **Quality of life in patients with ulcerative colitis.** *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* 2012, **116**(3):756-760.
148. Vucelic B: **Inflammatory bowel diseases: controversies in the use of diagnostic procedures.** *Dig Dis* 2009, **27**(3):269-277.
149. Baron JH, Connell AM, Lennard-Jones JE: **Variation between Observers in Describing Mucosal Appearances in Proctocolitis.** *British medical journal* 1964, **1**(5375):89-92.
150. Thia KT, Loftus EV, Jr., Pardi DS, Kane SV, Faubion WA, Tremaine WJ, Schroeder KW, Harmsen SW, Zinsmeister AR, Sandborn WJ: **Measurement of disease activity in ulcerative colitis: interobserver agreement and predictors of severity.** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(6):1257-1264.
151. Travis SP, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, Feagan BG, Hanauer SB, Lemann M, Lichtenstein GR *et al*: **Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS).** *Gut* 2012, **61**(4):535-542.
152. Morson BC: **Differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease.** *Materia medica Polona Polish journal of medicine and pharmacy* 1981, **13**(2):85-92.

153. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A: **Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2005, **11**(46):7227-7236.
154. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP: **Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history.** *Gut* 1998, **42**(3):387-391.
155. Ye BD, Yang SK, Boo SJ, Cho YK, Yang DH, Yoon SM, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Yu CS *et al*: **Clinical characteristics of ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis in Korea.** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(9):1901-1906.
156. Ye BD, Yang SK, Boo SJ, Cho YK, Yang DH, Yoon SM, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Yu CS *et al*: **Clinical characteristics of ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis in Korea.** *Inflammatory bowel diseases* 2010.
157. Hwangbo Y, Kim HJ, Park JS, Ryu KN, Kim NH, Shim J, Jang JY, Dong SH, Kim BH, Chang YW *et al*: **Sacroiliitis is common in Crohn's disease patients with perianal or upper gastrointestinal involvement.** *Gut and liver* 2010, **4**(3):338-344.
158. Toader E: **[Clinical extraintestinal manifestations in patients with ulcerative colitis].** *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* 2007, **111**(4):845-851.
159. de Vlam K, Mielants H, Cuvelier C, De Keyser F, Veys EM, De Vos M: **Spondyloarthropathy is underestimated in inflammatory bowel disease: prevalence and HLA association.** *The Journal of rheumatology* 2000, **27**(12):2860-2865.
160. Queiro R, Maiz O, Intxausti J, de Dios JR, Belzunegui J, Gonzalez C, Figueroa M: **Subclinical sacroiliitis in inflammatory bowel disease: a clinical and follow-up study.** *Clinical rheumatology* 2000, **19**(6):445-449.
161. Menachem Y, Gotsman I: **Clinical manifestations of pyoderma gangrenosum associated with inflammatory bowel disease.** *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2004, **6**(2):88-90.
162. Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, Dassopoulos T, Schumm P, Gregory FJ, Griffiths AM *et al*: **Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort.** *The American journal of gastroenterology* 2006, **101**(5):1012-1023.
163. Mintz R, Feller ER, Bahr RL, Shah SA: **Ocular manifestations of inflammatory bowel disease.** *Inflammatory bowel diseases* 2004, **10**(2):135-139.
164. Franks I: **Primary sclerosing cholangitis: High-dose ursodeoxycholic acid is associated with risk of colonic neoplasia in patients with PSC and ulcerative colitis.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2011, **8**(7):361.
165. Wasmuth HH, Trano G, Endreseth BH, Wibe A, Rydning A, Myrvold HE: **Primary sclerosing cholangitis and extraintestinal manifestations in patients with ulcerative colitis and ileal pouch-anal anastomosis.** *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2010, **14**(7):1099-1104.
166. Farkas K, Nagy F, Kovacs L, Csajbok E, Kovacs G, Wittmann T, Molnar T: **Ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis as part of autoimmune polyglandular syndrome type III.** *Inflammatory bowel diseases* 2010, **16**(1):10-11.
167. Cullen SN, Chapman RW: **The medical management of primary sclerosing cholangitis.** *Seminars in liver disease* 2006, **26**(1):52-61.
168. Talwalkar JA, Angulo P, Johnson CD, Petersen BT, Lindor KD: **Cost-minimization analysis of MRC versus ERCP for the diagnosis of primary sclerosing cholangitis.** *Hepatology* 2004, **40**(1):39-45.
169. Vitellas KM, Enns RA, Keogan MT, Freed KS, Spritzer CE, Baillie J, Nelson RC: **Comparison of MR cholangiopancreatographic techniques with contrast-enhanced cholangiography in the evaluation of sclerosing cholangitis.** *AJR American journal of roentgenology* 2002, **178**(2):327-334.
170. Reinshagen M: **Osteoporosis in inflammatory bowel disease.** *Journal of Crohn's & colitis* 2008, **2**(3):202-207.
171. McLaughlin SD, Perry-Woodford ZL, Clark SK, Johnson MW, Tekkis PP, Ciclitira PJ, Nicholls RJ: **Osteoporosis in patients over 50 years of age following restorative proctocolectomy for ulcerative colitis: is DXA screening warranted?** *Inflammatory bowel diseases* 2010, **16**(2):250-255.
172. Kitazaki S, Mitsuyama K, Masuda J, Harada K, Yamasaki H, Kuwaki K, Takedatsu H, Sugiyama G, Tsuruta O, Sata M: **Clinical trial: comparison of alendronate and alfacalcidol in glucocorticoid-associated osteoporosis in patients with ulcerative colitis.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2009, **29**(4):424-430.

173. Kulaylat MN, Dayton MT: **Ulcerative colitis and cancer**. *Journal of surgical oncology* 2010, **101**(8):706-712.
174. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K: **Cancer risks in ulcerative colitis patients**. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2008, **123**(6):1417-1421.
175. Karvellas CJ, Fedorak RN, Hanson J, Wong CK: **Increased risk of colorectal cancer in ulcerative colitis patients diagnosed after 40 years of age**. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 2007, **21**(7):443-446.
176. Baars JE, Looman CW, Steyerberg EW, Beukers R, Tan AC, Weusten BL, Kuipers EJ, van der Woude CJ: **The risk of inflammatory bowel disease-related colorectal carcinoma is limited: results from a nationwide nested case-control study**. *The American journal of gastroenterology* 2011, **106**(2):319-328.
177. Bergeron V, Vienne A, Sokol H, Seksik P, Nion-Larmurier I, Ruskone-Fourmestreaux A, Svrcek M, Beaugerie L, Cosnes J: **Risk factors for neoplasia in inflammatory bowel disease patients with pancolitis**. *The American journal of gastroenterology* 2010, **105**(11):2405-2411.
178. Claessen MM, Vleggaar FP, Tytgat KM, Siersema PD, van Buuren HR: **High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis**. *Journal of hepatology* 2009, **50**(1):158-164.
179. Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Brostrom O, Hellers G: **Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres**. *Gut* 1988, **29**(2):206-217.
180. Jayaram H, Satsangi J, Chapman RW: **Increased colorectal neoplasia in chronic ulcerative colitis complicated by primary sclerosing cholangitis: fact or fiction?** *Gut* 2001, **48**(3):430-434.
181. Jess T, Loftus EV, Jr., Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Schleck CD, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, Munkholm P *et al*: **Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota**. *Gastroenterology* 2006, **130**(4):1039-1046.
182. Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, Schaid DJ, Siems DM, Lindor NM: **Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study**. *Gastroenterology* 1998, **115**(5):1079-1083.
183. Nuako KW, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Siems DM, Zinsmeister AR: **Primary sclerosing cholangitis and colorectal carcinoma in patients with chronic ulcerative colitis: a case-control study**. *Cancer* 1998, **82**(5):822-826.
184. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V: **Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County**. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2004, **2**(12):1088-1095.
185. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF: **The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis**. *Gut* 2001, **48**(4):526-535.
186. Higashi D, Futami K, Ishibashi Y, Egawa Y, Maekawa T, Matsui T, Iwashita A, Kuroki M: **Clinical course of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis**. *Anticancer research* 2011, **31**(7):2499-2504.
187. Risques RA, Lai LA, Himmertoglu C, Ebaee A, Li L, Feng Z, Bronner MP, Al-Lahham B, Kowdley KV, Lindor KD *et al*: **Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation**. *Cancer research* 2011, **71**(5):1669-1679.
188. Velayos FS, Liu L, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Abramson O, Perry GS, Herrinton LJ: **Prevalence of colorectal cancer surveillance for ulcerative colitis in an integrated health care delivery system**. *Gastroenterology* 2010, **139**(5):1511-1518.
189. Chen J, Huang XF: **Beta-catenin pathway in ulcerative colitis-associated colorectal cancer and therapeutic implication**. *Journal of gastrointestinal cancer* 2009, **40**(1-2):64-65.
190. Kiran RP, Khoury W, Church JM, Lavery IC, Fazio VW, Remzi FH: **Colorectal cancer complicating inflammatory bowel disease: similarities and differences between Crohn's and ulcerative colitis based on three decades of experience**. *Annals of surgery* 2010, **252**(2):330-335.
191. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L: **Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies**. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2012, **10**(6):639-645.
192. Goede AC, Reeves A, Dixon AR: **Laparoscopic restorative proctocolectomy: a 10-year experience of an evolving technique**. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2011, **13**(10):1153-1157.
193. Maartense S, Dunker MS, Slors JF, Cuesta MA, Gouma DJ, van Deventer SJ, van Bodegraven AA, Bemelman WA: **Hand-assisted laparoscopic versus open restorative proctocolectomy with ileal**



- pouch anal anastomosis: a randomized trial.** *Annals of surgery* 2004, **240**(6):984-991; discussion 991-982.
194. Marcello PW, Milsom JW, Wong SK, Hammerhofer KA, Goormastic M, Church JM, Fazio VW: **Laparoscopic restorative proctocolectomy: case-matched comparative study with open restorative proctocolectomy.** *Diseases of the colon and rectum* 2000, **43**(5):604-608.
195. Ouaiissi M, Lefevre JH, Bretagnol F, Alves A, Valleur P, Panis Y: **Laparoscopic 3-step restorative proctocolectomy: comparative study with open approach in 45 patients.** *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques* 2008, **18**(4):357-362.
196. Church JM: **Functional outcome and quality of life in an elderly patient with an ileal pouch-anal anastomosis: a 10-year follow up.** *The Australian and New Zealand journal of surgery* 2000, **70**(12):906-907.
197. Pinto RA, Canedo J, Murad-Regadas S, Regadas SF, Weiss EG, Wexner SD: **Ileal pouch-anal anastomosis in elderly patients: is there a difference in morbidity compared with younger patients?** *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2011, **13**(2):177-183.
198. Chapman JR, Larson DW, Wolff BG, Dozois EJ, Cima RR, Pemberton JH, Crownhart BS, Larson DR: **Ileal pouch-anal anastomosis: does age at the time of surgery affect outcome?** *Arch Surg* 2005, **140**(6):534-539; discussion 539-540.
199. Hnatyszyn A, Szalata M, Stanczyk J, Cichy W, Slomski R: **Association of c.802C>T polymorphism of NOD2/CARD15 gene with the chronic gastritis and predisposition to cancer in H. pylori infected patients.** *Experimental and molecular pathology* 2010, **88**(3):388-393.
200. Xuan C, Zhang BB, Yang T, Deng KF, Li M, Tian RJ: **Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn's disease: a meta-analysis.** *International journal of colorectal disease* 2012, **27**(1):11-19.
201. Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Phromjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Summanapan S *et al*: **Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis.** *Genes and immunity* 2010, **11**(5):416-422.
202. Henckaerts L, Figueroa C, Vermeire S, Sans M: **The role of genetics in inflammatory bowel disease.** *Current drug targets* 2008, **9**(5):361-368.
203. Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I: **Genes, diet and inflammatory bowel disease.** *Mutation research* 2007, **622**(1-2):70-83.
204. Santiago JL, Martinez A, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, de la Concha EG, Urcelay E: **Evidence for the association of the SLC22A4 and SLC22A5 genes with type 1 diabetes: a case control study.** *BMC medical genetics* 2006, **7**:54.
205. Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW: **Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort.** *Immunology and cell biology* 2006, **84**(2):233-236.
206. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J: **The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2005, **129**(6):1854-1864.
207. Fisher SA, Hampe J, Onnie CM, Daly MJ, Curley C, Purcell S, Sanderson J, Mansfield J, Annese V, Forbes A *et al*: **Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease.** *Human mutation* 2006, **27**(8):778-785.