

Rozprawa doktorska

**Ocena ekspresji białek wstrząsu cieplnego 70 u chorych na wrzodziejące  
zapalenie jelita grubego**

Lek. med. Paweł Samborski

Promotor: Prof. dr hab. Marian Grzymiśławski

Praca realizowana dzięki grantowi naukowemu „Młodzi naukowcy” (projekt nr 502-14-02223360-10427) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki

Wydział Lekarski II

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2015

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi, Panu Profesorowi Marianowi Grzymiślawskiemu za nieocenione wsparcie podczas całej realizacji badań oraz pisania tej pracy,*

*a także Pani Dr Donacie Jarmołowskiej- Jurczyszyn, Panu Profesorowi Przemysławowi Majewskiemu oraz Panu Profesorowi Grzegorzowi Dworackiemu za ogromną pomoc w realizacji badań.*

*Dziękuję również Najbliższej Rodzinie za wsparcie.*

## **WYKAZ SKRÓTÓW**

### **1. WSTĘP**

#### 1.1. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

##### 1.1.1. Definicja

##### 1.1.2. Epidemiologia

##### 1.1.3. Patogeneza

##### 1.1.4. Obecność i rola autoprzeciwciał

##### 1.1.5. Objawy kliniczne

##### 1.1.6. Klasyfikacja montrealaska aktywności choroby

##### 1.1.7. Obraz endoskopowy

##### 1.1.8. Obraz histologiczny

##### 1.1.9. Leczenie

#### 1.2. Białka szoku cieplnego 70

##### 1.2.1. Białka szoku cieplnego

##### 1.2.2. Właściwości białek Hsp70

#### 1.3. Rola białek Hsp70 w procesie chorobowym wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

##### 1.3.1. Obecność białek Hsp70 w błonie śluzowej jelita

##### 1.3.2. Wpływ białek Hsp70 na proces zapalny w jelicie grubym

##### 1.3.3. Wpływ farmakoterapii na stężenie Hsp72

### **2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA**

### **3. MATERIAŁ I METODY**

#### 3.1. Materiał

##### 3.1.1. Grupa badana

##### 3.1.2. Grupa kontrolna

##### 3.1.3. Materiał tkankowy

#### 3.2. Metody

##### 3.2.1. Przeciwciała jelitowe

##### 3.2.2. Ekspresja Hsp70 i Hsc70

##### 3.2.3. Statystyka

##### 3.2.4. Zgoda komisji bioetycznej

#### **4. WYNIKI**

4.1. Charakterystyka badanej populacji

4.2. Porównanie ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z grupą kontrolną

4.3. Ocena korelacji ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 z aktywnością i zasięgiem choroby w grupie badanej

4.4. Ocena korelacji ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 ze stężeniem parametrów stanu zapalnego oraz obecnością przeciwciał swoistych dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

4.5. Analiza występowania autoprzeciwciał pANCA i GAB

#### **5. DYSKUSJA**

5.1. Charakterystyka ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego

5.2. Porównanie ekspresji białka Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z jego ekspresją w populacji niechorującej na nieswoiste zapalenia jelit

5.3. Związek ekspresji białka Hsp70 z aktywnością wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

5.4. Porównanie ekspresji białka Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z populacją niechorującą na nieswoiste zapalenia jelit

5.5. Związek ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 z występowaniem autoprzeciwciał pANCA i GAB u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego

5.6. Ocena zależności ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 ze wskaźnikami stanu zapalnego

#### **6. WNIOSKI**

#### **7. PIŚMIENNICTWO**

#### **8. STRESZCZENIE**

#### **9. SUMMARY**

#### **10. SPIS RYCIN**

#### **11. SPIS TABEL**

**12. SPIS WYKRESÓW**

**13. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA**

## WYKAZ SKRÓTÓW

**APC** – komórka prezentująca antygen (ang. *antigen-presenting cell*)

**ASCA** – przeciwciała przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ang. *anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*)

**GAB** – przeciwciała przeciwko komórkom kubkowym jelita (ang. *anti-goblet cells antibodies*)

**HLA** – ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *human leukocyte antigens*)

**HSBP** – białko wiążące czynnik transkrypcyjny białek szoku cieplnego (ang. *heat shock transcription factor binding protein*)

**Hsc70** – (ang. *heat shock cognate protein 70*)

**HSE** – sekwencja DNA wiążąca czynnik transkrypcyjny białek szoku cieplnego (ang. *heat shock promotor element*)

**HSF** – czynnik transkrypcyjny białek szoku cieplnego (ang. *heat shock transcription factor*)

**HSPA** – gen kodujący białka szoku cieplnego

**Hsp70** – białko szoku cieplnego 70 (ang. *heat shock protein 70*)

**IBD** – nieswoiste zapalenia jelit (ang. *inflammatory bowel diseases*)

**ICAM1** – międzykomórkowa molekula adhezyjna-1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1*)

**IFN** – interferon

**IL** – interleukina

**LPS** – lipopolisacharydy (ang. *lipopolysaccharides*)

**MHC** – główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)

**PAB** – przeciwciała przeciwko części zewnątrzwydzielniczej trzustki (ang. *anti-exocrine pancreas antibodies*)

**pANCA** – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów o okołojądrowym typie świecenia (ang. *perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

**SIBO** – zespół przerostu flory bakteryjnej jelita (ang. *small intestinal bacterial overgrowth*)

**Th** – limfocyty T pomocnicze (ang. *T helper cell*)

**TLR** – receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*)

**TNF** – czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*)

**VCAM1** – molekula adhezyjna-1 komórki naczyniowej (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*)

**VLA4** – późny antygen 4 (ang. *very late antigen 4*)

**WZJG** – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

## **1. WSTĘP**

### **1.1. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego**

#### **1.1.1. Definicja wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) jest przewlekłą chorobą zapalną o niewyjaśnionej etiologii, przebiegającą z zajęciem błony śluzowej jelita grubego w okolicy odbytnicy i zajmującą okrężnicę przez ciągłość w kierunku proksymalnym na różnym odcinku; przebieg choroby charakteryzuje się okresami zaostrzeń i remisji [1].

#### **1.1.2. Epidemiologia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

WZJG jest chorobą występującą na całym świecie, jednak od lat obserwuje się pewne trendy i różnice w częstości pojawiania się tej choroby w poszczególnych regionach. Najlepiej udokumentowaną w badaniach epidemiologicznych zapadalność na nią opisano dla Europy – wynosi ona średnio 10.4/100 000 i jest nieco wyższa w krajach północnej (11.8/100 000) niż południowej (8.7/100 000) części kontynentu [2]. Od dawna uważano, że częstość występowania WZJG w Europie jest wyraźnie wyższa w krajach położonych na północy niż w jej części południowej. Obserwowano również nieco słabszą, ale także widoczną w badaniach epidemiologicznych tendencję do mniejszej częstości zachorowań w krajach położonych na wschodzie, niż na zachodzie Europy. Przytoczone powyżej dane zaskoczyły jednak badaczy znacznie mniejszą różnicą niż spodziewana. W najnowszych badaniach epidemiologicznych obserwuje się pewną stabilizację wskaźników zachorowalności na WZJG w krajach północy i zachodu Europy. Z kolei w rejonach południowych i wschodnich kontynentu zapadalność na tę chorobę wyraźnie rośnie [3]. W ostatnim czasie epidemiolodzy skłaniają się ku opinii, że różnice w częstości zachorowań



między północą a południem nie są aż tak duże, wyraźniejsza zaś wydaje się dodatnia korelacja między zapadalnością na chorobę a wysokością produktu krajowego brutto [4]. Zgodnie z tymi obserwacjami największą częstość zachorowań odnotowuje się w państwach wysoko uprzemysłowionych, w krajach rozwijających się wskaźnik zapadalności podnosi się wraz z rosnącym poziomem życia, a najniższy jest wciąż w rejonach o niskim stopniu rozwoju ekonomicznego. W ostatnich latach zmienia się też częstość zachorowań na poszczególnych kontynentach. W przeszłości zdecydowanie większa była ona w Ameryce Północnej i Europie, obecnie natomiast rośnie także w Azji i Ameryce Południowej [5].

W ciągu ostatnich 20 lat obserwuje się wyraźną tendencję do wzrostu liczby zachorowań na WZJG oraz chorobę Leśniowskiego-Crohna, która jest wciąż rzadszą jednostką chorobową w grupie nieswoistych zapaleń jelit. Wzrost ów dobrze udokumentowano w populacji skandynawskiej, w której od wielu lat obserwowano stosunkowo dużo zachorowań na te choroby [6, 7]. Jeszcze wyraźniejszy wzrost zapadalności, bo aż 3-krotny, opisano w populacji chińskiej [8]. Szczyt zachorowalności na wrzodziejące zapalenie jelita grubego występuje w okolicach 15-35 roku życia, rzadko natomiast pojawiają się przypadki choroby przed 10 rokiem życia [9]. Nie ma wyraźnej różnicy występowania WZJG zależnie od płci [4], jakkolwiek w niektórych badaniach wśród populacji osób starszych niż typowy szczyt zachorowań, tzn. w piątej i szóstej dekadzie życia, udokumentowano nieco wyższą zapadalność mężczyzn na tę chorobę [5].

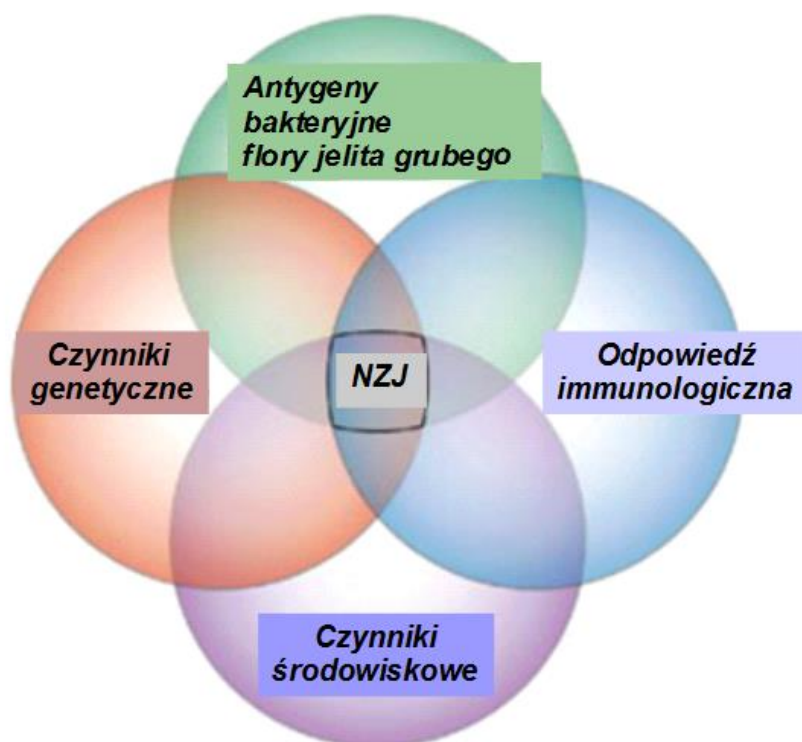
Częstość zachorowań na WZJG zmienia się w ostatnich latach także w populacji pediatrycznej – od lat osiemdziesiątych systematycznie wzrasta. Obserwuje się także więcej rozpoznań w najmłodszych grupach wiekowych. Podobnie jak w dorosłej populacji, częściej chorują dzieci w krajach wysoko rozwiniętych [10].

Sytuacja epidemiologiczna w Polsce nie odbiega znacząco od ogólnoswiatowych trendów i jest zbliżona do stanu w krajach o podobnym położeniu geograficznym (środkowa Europa) i zbliżonych warunkach ekonomicznych. W ostatnich dziesięcioleciach odnotowuje się wzrost zapadalności na wrzodziejące zapalenie jelita grubego w Polsce, z nieco rosnącym udziałem zachorowań na terenach wiejskich, choć wciąż wśród chorych dominują mieszkańcy dużych aglomeracji. W ostatnich latach zaobserwowano nieco wyższą zapadalność wśród mężczyzn w porównaniu z kobietami (1,3 : 1). Podobnie jak na całym

świecie, w Polsce przeważają przypadki lewostronnej manifestacji choroby; objęcie nią całego jelita grubego częściej występuje w młodszej populacji pacjentów. WZJG jest w Polsce wciąż dominującym rozpoznaniem w grupie nieswoistych zapaleń jelit, jednak wzrost częstości zachorowań jest znacznie bardziej dynamiczny dla choroby Leśniowskiego-Crohna [11].

### 1.1.3. Etiopatogeneza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

WZJG jest chorobą o wciąż nieznannej etiologii. Etiopatogeneza choroby jest bardzo złożona, z udziałem czynników genetycznych, immunologicznych oraz środowiskowych (przedstawiono schematycznie na rycinie 1.).

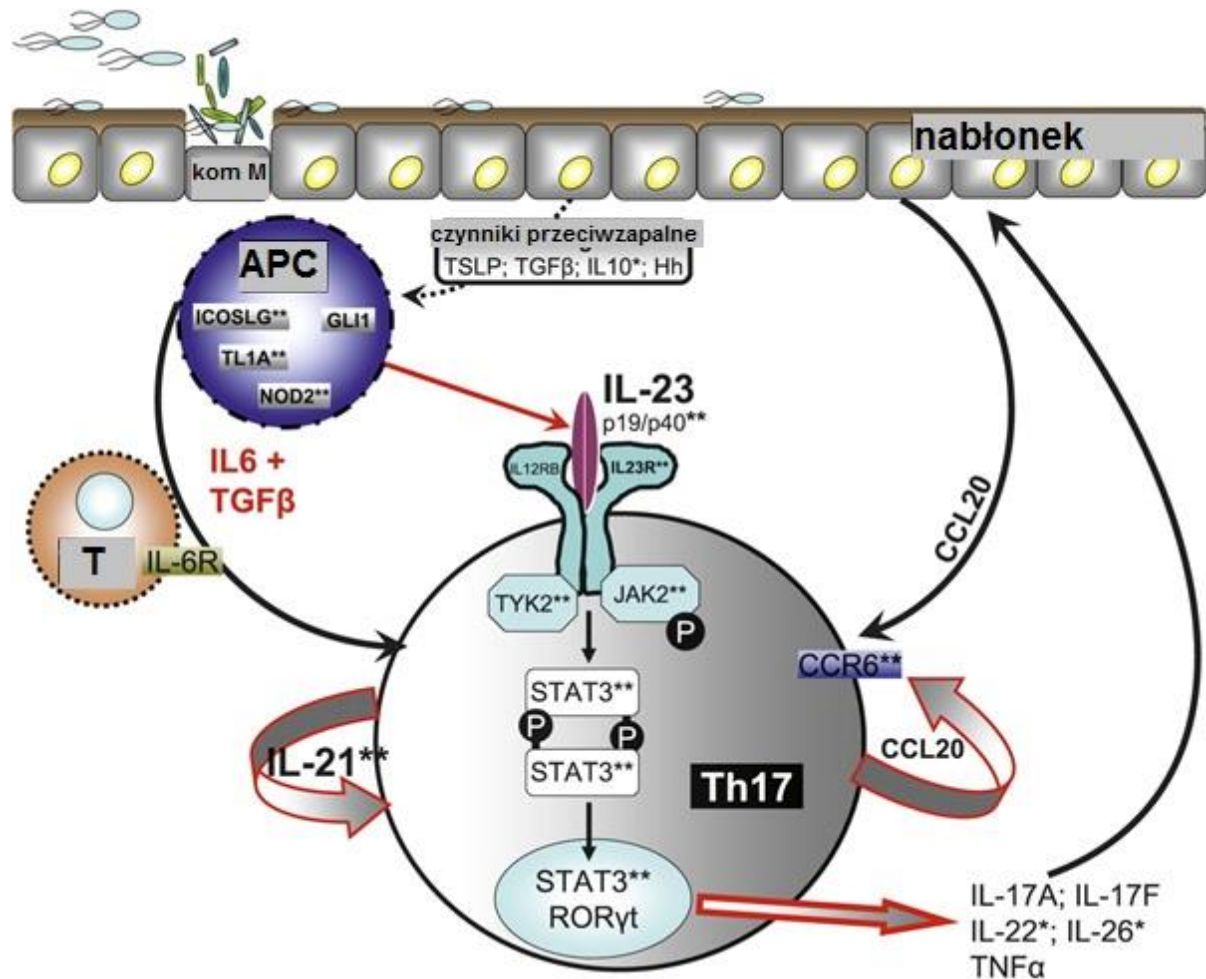


Rycina 1. Interakcje różnych czynników etiopatologicznych nieswoistych zapaleń jelit (IBD). Rycina na podstawie *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3(7):390-407, w modyfikacji własnej.

W około 6-7% przypadków WZJG obserwuje się występowanie rodzinne [12]. Ryzyko współwystąpienia choroby u bliźniąt jednojajowych wynosi 10%, u bliźniąt dwujajowych 7% [13]. Zjawisko to sugeruje udział czynników genetycznych. Jest to jednak na tyle niski odsetek, że nie można uważać tych czynników za jedyne, czy choćby dominujące w patogenezie choroby. Zidentyfikowano natomiast pewien związek niektórych genów z występowaniem czy przebiegiem choroby. Należy do nich między innymi gen MDR1 (*multidrug resistance gene 1*), który wykazuje związek z odpowiedzią na leczenie WZJG. Zaobserwowano, że delecja tego genu u myszy powoduje wystąpienie zapalenia jelita grubego [14]. Udowodniono również związek haplotypu HLA-DRB 0103 z ciężkim przebiegiem WZJG i częstą koniecznością leczenia chirurgicznego [15]. O wpływie genów na wystąpienie choroby świadczą także różnice w zapadalności pomiędzy różnymi rasami i grupami etnicznymi – WZJG jest częstsze u rasy kaukaskiej, szczególnie dużą liczbę zachorowań obserwuje się zaś w populacji Żydów aszkenazyjskich [5, 15].

Czynniki immunologiczne od lat są uważane za kluczowe w patogenezie WZJG. Wiedza na ten temat jest wciąż poszerzana i wzbogacana o wyniki najnowszych badań. Fakt nieprawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego związanego ze wzmożoną aktywacją limfocytów T CD4+ jest wspólny dla nieswoistych zapaleń jelit – choroby Leśniowskiego-Crohna i WZJG. W patogenezie pierwszej z chorób główną rolę odgrywa subpopulacja komórek Th1 i związana z nią produkcja cytokin prozapalnych (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Taki profil cytokin indukuje dalszy przebieg procesów patologicznych pod postacią naciekania przez komórki zapalne ściany jelita oraz tworzenia ziarniniaków [16]. We WZJG z kolei obserwuje się wzmożoną aktywność komórek Th2 produkujących interleukiny 4, 5 [17]. Cytokiny te stymulują produkcję przeciwciał oraz naciekanie błony śluzowej jelita grubego przez granulocyty obojętnochłonne. We WZJG dochodzi także do aktywacji komórek T typu NK (*natural killer*) syntetyzujących IL-13 [18]. Ten ostatni mechanizm procesu zapalnego we WZJG jest aktualnie przedmiotem badań i nadziei na stworzenie nowych możliwości terapeutycznych [19]. W ostatnim czasie duże zainteresowanie badaczy budzi także odkryta w 2005 roku subpopulacja limfocytów Th17 [20]. Komórki te, stymulowane przez IL-23, produkują szereg cytokin prozapalnych (między innymi IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ ), które mogą inicjować proces zapalny w nieswoistych zapaleniach jelit [24]. Wiele spośród czynników

genetycznych warunkujących podatność na zachorowanie na nieswoiste zapalenia jelit oraz geny wpływające właśnie na aktywność limfocytów Th17 i ich wrażliwość na stymulację przez IL-23 (rycina 2.) [25].



Rycina 2. Ścieżka stymulacji limfocytów Th17 przez IL-23, z uwzględnieniem roli genów podatności na zachorowanie na nieswoiste zapalenia jelit (\*) oraz genów sprzyjających wystąpieniu także innych chorób z autoagresji (\*\*). STAT3 - *signal transducer and activator of transcription 3*; JAK2 - *Janus kinase 2*; TYK2 - *tyrosine kinase 2*; TGFβ - *transforming growth factor β*; RORγt - *RAR-related orphan receptor γ*; TSLP - *thymic stromal lymphopietin*; Hh - *epithelial hedgehog*. CCR6 - *chemokine receptor 6*; CCL20 - *chemokine ligand 20*; kom M - komórka M nabłonka limfoidalnego jelit; ICOSLG - *inducible T-cell co-stimulator ligand*; GLI1 - *glioma-associated oncogene 1*; TL1A - *TNF-like ligand A*; NOD2 - *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*. Rycina na podstawie Gut 2011;60:1739-1753, w modyfikacji własnej.

Kolejnym istotnym elementem obserwowanym w patogenezie WZJG jest dysfunkcja receptorów Toll-podobnych TLR (*Toll-like receptors*). Struktury te odpowiadają za rozpoznawanie antygenów bakteryjnych mających kontakt z błoną śluzową jelita. W przypadku infekcji patogennymi bakteriami uruchamiają one kaskadę reakcji immunologicznej. Odpowiadają również za homeostazę błony śluzowej jelita i prawidłowe funkcjonowanie bariery jelitowej. We WZJG oraz chorobie Leśniowskiego-Crohna zauważono nieprawidłową pracę rodziny receptorów TLR-4 [15].

Przedmiotem aktualnych badań jest również udział śródbłonkowych molekuł adhezyjnych w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit. Istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego w tych chorobach przypisuje się między innymi cząsteczkom VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), VLA4 (*very late antigen 4*) i ICAM1 (*intracellular adhesion molecule 1*). Ich ekspresja w śródbłonku jest stymulowana przez cytokiny prozapalne. Molekuły te, za pomocą chemoatraktantów, przyciągają leukocyty (głównie granulocyty obojętnochłonne i monocyty) z krwi obwodowej do miejsca tworzenia nacieku zapalnego [14, 26]. Obecnie molekuły adhezyjne śródbłonka, z uwagi na ich istotny udział w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit, są rozważane jako cel terapii z zastosowaniem leków biologicznych. Wyprodukowano już pierwsze przeciwciała monoklonalne przeciwko integrynie  $\alpha 4$  oraz  $\alpha 4\beta 7$  – leki znajdują się w fazie badań i są nadzieją na nowe możliwości terapeutyczne zarówno w chorobie Leśniowskiego-Crohna, jak i WZJG [24, 25].

Czynniki środowiskowe odgrywają niezwykle istotną rolę w patogenezie WZJG. Jest to bardzo obszerna grupa czynników, obejmująca m.in. styl życia, współistniejące i przebyte choroby czy życie płodowe.

Wpływ palenia papierosów na WZJG od lat jest tematem budzącym kontrowersje. W kilku dużych badaniach udało się dowieść, że palenie papierosów zmniejsza ryzyko zachorowania na WZJG, a w przypadku zdiagnozowanych chorych koreluje z lżejszym przebiegiem choroby i lepszą reakcją na leczenie w porównaniu z niepalącymi. Co ciekawe, w populacji osób, które rzuciły palenie w przeszłości, ryzyko zachorowania i ciężkiego przebiegu choroby jest najwyższe (wyższe nawet niż w populacji nigdy niepalących) [5, 26]. Jednak nie wszystkie badania potwierdzają korzystny wpływ palenia papierosów na przebieg

WZJG [27]. Nie udało się także dowieść zasadności stosowania nikotyny terapeutycznie w zaostreniach choroby, w celu uzyskania remisji. Udowodniono wprawdzie przewagę podawania nikotyny nad placebo, wyniki leczenia były jednak gorsze w porównaniu z klasycznym leczeniem (systemowe glikokortykosteroidy) przy większej liczbie działań niepożądanych [28, 29].

Poszukuje się także związku między dietą a zachorowaniem i przebiegiem nieswoistych zapaleń jelit. Aktualnie najwięcej danych sugeruje niekorzystny wpływ diety bogatej w węglowodany proste na ryzyko zachorowania na WZJG. Istnieją jednak także analizy, w których takiej korelacji nie udało się udowodnić [15, 30]. Badania zmierzające do oceny możliwości terapeutycznych diety z ograniczeniem cukrów prostych nie uwidocznily także wyraźnej korelacji, dlatego nie udało się ustalić jednolitych zaleceń dietetycznych w tym zakresie. Pojawiają się również badania sugerujące związek udziału tłuszczu w diecie z zapadalnością na WZJG. Duża zawartość kwasów tłuszczowych jednonienasyconych i wielonienasyconych w spożywanych pokarmach zwiększa ryzyko zachorowania [31]. Wyjątkiem są prawdopodobnie kwasy wielonienasycone  $\Omega$ -3, których znaczna zawartość w diecie może być czynnikiem zmniejszającym zapadalność na WZJG [32].

We WZJG, podobnie jak w wielu innych chorobach o podłożu autoimmunologicznym, istnieje sporo teorii wiążących fakt zachorowania z czynnikami infekcyjnymi. W analizie częstości zapadania na infekcje w wieku dziecięcym wykazano, iż chorzy na IBD przebyli ich więcej w porównaniu z grupą kontrolną. Byli też częściej leczeni antybiotykami z powodu zapaleń gardła i ucha oraz częściej przebyli zabieg tonsillektomii [33]. Istnieją także badania sugerujące związek kontaktu z wirusami z grupy *paromyxoviridae*, przede wszystkim ospy wietrznej. Większą częstość zachorowań na IBD obserwuje się w populacji osób, które przebyły infekcję zarówno w dzieciństwie, jak i w życiu płodowym. Hipotezy o związku szczepienia żywą szczepionką przeciwko ospie z zachorowalnością na nieswoiste zapalenia jelit nie udało się przekonująco udowodnić [5]. Nie do końca wyjaśniony jest także związek infekcji bakteryjnych atypowymi bakteriami z grupy *Mycobacteriae* z zachorowalnością na IBD. Niektóre badania wykazują istotnie częstszą obecność bakterii *Mycobacterium avis* w błonie śluzowej jelita osób chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna, niż jest to obserwowane w ogólnej populacji [19]. W patogenezie IBD mogą również odgrywać rolę infekcje bakteriami *Listeria*, *Streptococcus* oraz niektórymi szczepami *Escherichia coli*.

Antygeny dwóch ostatnich bakterii są często spotykane w makrofagach tworzących nacieki zapalne w chorobie Leśniowskiego-Crohna [34].

Ogromne znaczenie w homeostazie przewodu pokarmowego mają fizjologiczna flora bakteryjna błony śluzowej jelita oraz bakterie komensalne. Zaburzenia tej flory mogą być przyczyną zaostrzenia WZJG lub nawet brać udział w patogenezie choroby. Udowodniono również korzyści terapeutyczne z podawania preparatów niektórych szczepów bakterii probiotycznych, między innymi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [35]. Z drugiej strony, nadmierny rozwój niektórych bakterii komensalnych, w tym *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* czy *Enterococcus*, może być jednym z czynników sprzyjających wystąpieniu WZJG lub zaostrzeniom w przebiegu choroby [36].

Rozważany jest również wpływ antykoncepcji hormonalnej stosowanej przez kobiety na zachorowalność oraz przebieg nieswoistych zapaleń jelit. Stosowanie antykoncepcji może zwiększać ryzyko zachorowania na nieswoiste zapalenia jelit, chociaż niewiele jest badań, w których udało się tę tezę wyraźnie udowodnić. Potencjalny mechanizm, przez który miałyby się wyrażać niekorzystny wpływ preparatów hormonalnych, to działanie na układ krzepnięcia sprzyjające lokalnej zakrzepicy w małych naczyniach błony śluzowej jelita [37].

#### 1.1.4. Rola autoprzeciwciał we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego

W patogenezie WZJG istotną rolę odgrywa wspomniana w poprzednim rozdziale nadmierna aktywacja komórek Th2 i w konsekwencji produkcja autoprzeciwciał. Wykrywane w surowicy krwi chorych przeciwciała są znane od lat i stanowią istotne narzędzie diagnostyczne, szczególnie w różnicowaniu nieswoistych zapaleń jelit – WZJG i choroby Leśniowskiego-Crohna. Wciąż nie jest natomiast dokładnie wyjaśniona ich rola w przebiegu choroby. Najprawdopodobniej nie polega ona na bezpośrednim uszkodzeniu ściany jelita. Uważa się raczej, iż obecność przeciwciał jest wyrazem nieprawidłowej aktywności układu immunologicznego, doprowadzającej do powstania choroby [38]. Często zresztą stwierdzenie przeciwciał w surowicy krwi osób bez dolegliwości wyprzedza (nawet o lata) wystąpienie typowych objawów klinicznych i rozpoznanie choroby [39]. Obecnie głównym

zastosowaniem oznaczania przeciwciał jest uzupełnianie diagnostyki IBD. Często układ wykrywanych w surowicy chorego przeciwciał pozwala na różnicowanie choroby Leśniowskiego-Crohna i WZJG w przypadkach trudnych diagnostycznie, kiedy obraz kliniczny, endoskopowy i histopatologiczny choroby nie jest jednoznaczny. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że oznaczenie specyficznych przeciwciał charakteryzuje się przede wszystkim wysoką swoistością diagnostyczną. Ich zastosowanie ogranicza jednak niezbyt wysoka czułość diagnostyczna.

Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów z okołojądrowym typem świecenia (pANCA) to wraz z przeciwciałami przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) najdłużej stosowane w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit przeciwciała. Przeciwciała pANCA nie są skierowane bezpośrednio przeciwko błonie śluzowej jelita, ale przeciwko bakteriom wchodzącym w skład fizjologicznej flory okrężnicy, w tym *Pseudomonas*. Oznaczenie pANCA charakteryzuje się wysoką swoistością dla WZJG, podczas gdy oznaczenie ASCA jest wysoce swoiste dla choroby Leśniowskiego-Crohna. Wynik dodatni pANCA i ujemny ASCA (+ pANCA/ASCA-) w dużym badaniu na populacji pediatrycznej okazał się narzędziem o czułości 70% i swoistości 93%. W całej populacji chorych dorosłych i nieletnich czułość była jeszcze niższa (55.3%) [40]. To badanie, podobnie jak wiele innych, pokazuje główne ograniczenie zastosowania oznaczania przeciwciał w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit, jakim jest stosunkowo niska czułość. Znaczny odsetek wyników fałszywie ujemnych zdaje się także zaprzeczać tezie, jakoby obecność przeciwciał pANCA była niezbędnym, kluczowym elementem w patogenezie WZJG. Ich oznaczenie wciąż pozostaje jednak bardzo przydatnym badaniem jako dodatkowy element diagnostyki, wspólnie z oceną kliniczną, endoskopową i histopatologiczną [41].

Oznaczenie przeciwciał przeciwko komórkom kubkowym jelita (GAB) jest bardziej swoiste dla WZJG niż pANCA, lecz charakteryzuje się jeszcze niższą czułością (czułość 25%, swoistość 95%) [42]. Są to przeciwciała skierowane bezpośrednio przeciwko elementom strukturalnym błony śluzowej jelita grubego – mukopolisacharydom komórek kubkowych [43]. Prawdopodobnie nie istnieje bezpośredni mechanizm udziału przeciwciał GAB w patogenezie WZJG, jednak ich znaczenie kliniczne jest wciąż przedmiotem badań. Odkryto między innymi, że ich stwierdzenie u osoby bez rozpoznanej choroby wiąże się z podwyższonym ryzykiem zachorowania w przyszłości. W rodzinach chorych na WZJG z



obecnością przeciwciał GAB choroba występuje też częściej, niż w przypadku rodzin chorych bez stwierdzonych przeciwciał [44].

W diagnostyce różnicowej WZJG i choroby Leśniowskiego-Crohna często oznacza się także przeciwciała przeciwko części zewnątrzwydzielniczej trzustki (PAB). Są one wysoce swoiste dla choroby Leśniowskiego-Crohna (95%), jednak ich czułość jest niewielka (47%) [43]. Podobnie jak przeciwciała GAB, PAB prawdopodobnie nie mają bezpośredniego udziału w patogenezie IBD. Ich obecność może jednak pomagać w przewidywaniu przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna oraz odpowiedzi na leczenie [45].

W ostatnich latach zidentyfikowano nieznanne do tej pory przeciwciała pojawiające się w przebiegu IBD, głównie w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Przeciwciała przeciwko porynie błonowej (Omp – *anti-outer membrane protein*), przeciwko *Pseudomonas fluorescens* (anty-I2) oraz flagelinie bakteryjnej (anti-A4-Fla2 i Fla-X) mają prawdopodobnie niewielkie znaczenie kliniczne.

Diagnostyka serologiczna nieswoistych zapaleń jelit jest wciąż przedmiotem wielu badań. Nie udało się między innymi ustalić, czy oznaczenie przeciwciał jest przydatne wyłącznie diagnostycznie, czy ma ono również znaczenie kliniczne. Pojawiają się wciąż nowe opracowania dowodzące korelacji obecności niektórych przeciwciał z rokowaniem lub przebiegiem nieswoistego zapalenia jelit (na przykład koniecznością interwencji chirurgicznej). Obecnie w praktyce klinicznej najczęściej stosuje się oznaczenie 4 najlepiej poznanych przeciwciał: pANCA, ASCA, GAB oraz PAB. Ich zastosowaniem jest głównie różnicowanie nieswoistych zapaleń jelit, których na podstawie obrazu klinicznego, endoskopowego oraz histologicznego nie udało się jednoznacznie sklasyfikować jako WZJG lub choroba Leśniowskiego-Crohna, tak zwane *colitis indeterminata*. Problem ten dotyczy od 5 do 15% rozpoznawanych nieswoistych zapaleń jelit [46]. Tacy chorzy są poddawani często wieloletniej obserwacji i mają wielokrotnie powtarzane badania diagnostyczne, zanim uda się ustalić ostateczne rozpoznanie WZJG lub choroby Leśniowskiego-Crohna. Czas od początku wystąpienia dolegliwości do ustalenia diagnozy w tych przypadkach wynosi średnio 10,7 lat. Często wynik profilu przeciwciał sugeruje rozpoznanie jeszcze przed pojawieniem się typowych wykładników endoskopowych lub histologicznych [47].

### 1.1.5. Objawy kliniczne wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Podstawowym objawem WZJG zgłaszanym okresowo przez 90% chorych jest obecność krwi w stolcu. Zależnie od ciężkości zaostrzenia i rozległości zmian chorobowych może się ona manifestować krwistą biegunką, krwawieniem z odbytu lub krwią zmieszaną ze stolcem. Rzadziej zgłaszanym objawem jest ból brzucha, często związany z rytmem wypróżnień – nasilający się przed oddaniem stolca i ustępujący w momencie defekacji. Najczęściej ból lokalizuje się w okolicy lewego dołu biodrowego. Objawem charakterystycznym, choć nie patognomicznym dla WZJG, jest przerywanie snu i oddawanie stolca w ciągu nocy. Do objawów ogólnych WZJG, sugerujących zwykle ciężkie zaostrzenie, należą: gorączka, utrata masy ciała, ogólne osłabienie, tachykardia i niedokrwistość z niedoboru żelaza, często znacznego stopnia [48]. Obrazu klinicznego zaostrzenia choroby dopełniają wyniki badań laboratoryjnych wskazujące na podwyższone, nieraz w znacznym stopniu, wskaźniki ostrej fazy. W praktyce klinicznej aktualnie najczęściej wykorzystywane jest białko C reaktywne (CRP) z uwagi na znaczną czułość oraz szeroką dostępność badania w laboratoriach. Inne białka ostrej fazy są oznaczane znacznie rzadziej z powodu braku powszechnej dostępności, publikacje z ostatnich lat podkreślają jednak ich wartość. Dowiedziono między innymi, iż analiza stężenia i stopnia glikozylacji takich białek ostrej fazy, jak  $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina,  $\alpha$ -1-antychymotrypsyna, transferyna czy surowiczy amyloid A może mieć istotne znaczenie w dokładnym wyjaśnieniu patogenezy WZJG oraz być pomocna w praktyce klinicznej [49, 50]. W przypadku chorych z przewlekłą, ciężką biegunką w przebiegu WZJG mogą pojawiać się także objawy niedożywienia: hipalbuminemia, niedobory witamin, szczególnie witaminy B1 oraz B12, osteoporoza (jako konsekwencja niedoboru witaminy D i wapnia, ale też przewlekłego leczenia glikokortykosteroidami).

Dodatkowo u chorych mogą wystąpić powikłania jelitowe, najczęściej w czasie ciężkich zaostrzeń. Należą do nich: polipowatość zapalna (najczęstsze powikłanie jelitowe spotykane u 13- 15% chorych), ostre, toksyczne rozdęcie okrężnicy (rzadsze, spotykane u 3- 4% – jest to stan bezpośredniego zagrożenia życia), wolna perforacja jelita grubego (zwykle przebiegająca z klinicznym obrazem ostrego brzucha) oraz masywny krwotok z jelita

grubego (konsekwencją jest ostra niedokrwistość). Część powikłań nie wiąże się bezpośrednio z ostrym rzutem choroby, lecz występuje zwykle u chorych z długotrwałym przebiegiem choroby. Do powikłań takich należą: zwężenie jelita grubego, rak jelita grubego (z uwagi na to powikłanie chorym należy regularnie wykonywać przesiewową kolonoskopię) oraz zmiany w okolicy odbytu (żylaki, szczeliny, ropnie) [51].

WZJG, podobnie jak choroba Leśniowskiego-Crohna, jest uważane za chorobę układową, ponieważ u wielu chorych występują tak zwane objawy lub powikłania pozajelitowe. Są to choroby narządów innych niż jelito grube, występujące u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. Niektóre powikłania wiążą się ściśle z ostrym rzutem WZJG i często ustępują podczas leczenia zaostrzenia. Należą do nich powikłania oczne (zapalenie tęczówki oraz błony naczyniowej oka), zapalenie dużych stawów, powikłania dermatologiczne (między innymi rumień guzowaty, zgorzelinowe zapalenie skóry), powikłania zakrzepowo-zatorowe. Powikłania pozajelitowe przebiegające niezależnie od stopnia aktywności zapalenia jelita grubego obejmują: choroby wątroby (niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych i związane z nim ryzyko raka dróg żółciowych) oraz choroby układu kostno-stawowego (zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa, zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych, osteoporozę) [52].

#### 1.1.6. Klasyfikacja montrealaska aktywności choroby

Przebieg naturalny WZJG charakteryzuje się okresami zaostrzeń i remisji. W okresie remisji chorzy nie zgłaszają żadnych dolegliwości. Okresy zaostrzeń charakteryzują się różną częstością, czasem trwania i stopniem ciężkości. Mogą występować spontanicznie, bez uchwytnej przyczyny, lub być prowokowane jednym z czynników sprzyjających aktywności choroby, takich jak stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych czy długotrwały stres emocjonalny. Na podstawie nasilenia objawów ogólnych chorego ocenia się stopień ciężkości rzutu choroby. Obecnie stosuje się wprowadzoną w 2006 roku klasyfikację montrealską aktywności choroby. W dużej mierze opiera się ona na stosowanej wcześniej

przez ponad 50 lat skali Truelove i Wittsa. Chorych bezobjawowych (S0) klasyfikuje się jako będących w remisji choroby. Pacjenci zgłaszający biegunkę nieprzekraczającą 4 wypróżnień na dobę i bez objawów ogólnoustrojowych mają lekki rzut choroby (S1). Rzut średnio ciężki (S2) rozpoznaje się w przypadku biegunki przekraczającej 4 wypróżnienia na dobę i minimalnych objawów ogólnoustrojowych. Ciężki rzut choroby (S3) charakteryzują: biegunka przekraczająca 6 wypróżnień na dobę oraz objawy ogólnoustrojowe, jak tachykardia (częstość pracy serca powyżej 90/minutę), ciepłota ciała powyżej 37.5 st. C, OB (odczyn Biernackiego) powyżej 30/h oraz niedokrwistość ze stężeniem hemoglobiny poniżej 10.5 g/dl [53]. Szczegółowo klasyfikację przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska aktywności choroby**

Aktywność		Definicja
<b>S0</b>	Remisja kliniczna	bez objawów
<b>S1</b>	Łagodny rzut choroby	do 4 stolców na dobę z obecnością krwi lub bez, brak objawów ogólnoustrojowych, prawidłowe OB
<b>S2</b>	Średnio ciężki rzut choroby	ponad 4 stolce na dobę z obecnością krwi, minimalne objawy ogólnoustrojowe
<b>S3</b>	Ciężki rzut choroby	6 lub więcej stolców na dobę z obecnością krwi, objawy ogólnoustrojowe (HR>90/min, temp.>37.5 st C, Hb<10.5 g/dl, OB>30/h)

**OB – odczyn Biernackiego, HR – częstość pracy serca, temp. – temperatura ciała, Hb – hemoglobina**

### 1.1.7. Obraz endoskopowy WZJG

Kolonoskopia jest złotym standardem w diagnostyce WZJG. Badania endoskopowe są również podstawową metodą monitorowania przebiegu choroby, rozpoznawania zaostrzeń oraz profilaktyki raka jelita grubego w przebiegu WZJG. Obraz makroskopowy błony śluzowej jelita grubego często daje niemal pewne potwierdzenie podejrzenia klinicznego, choć pełny obraz WZJG powinno dopełniać rozpoznanie histopatologiczne.

Zmiany w przebiegu WZJG zaczynają się zawsze w odbytnicy i szerzą proksymalnie w sposób ciągły, bez odcinków niezmienionej błony śluzowej. Granica aktywnych zmian jest zwykle wyraźnie widoczna makroskopowo. Zakres zmian różni się u poszczególnych chorych – może ograniczać się do odbytnicy lub rozciągać dalej, zajmując nieraz całe jelito grube do kątnicy. Na tej podstawie stworzono klasyfikację montrealską zasięgu choroby, w której wyróżniono trzy postaci WZJG. Pierwsza (E1) to inaczej wrzodziejące zapalenie odbytnicy, kolejna (E2) to postać lewostronna lub dystalna, w której zmiany sięgają maksymalnie do zagięcia śledzionowego. Ostatnia (E3) to zapalenie całego jelita grubego (*pancolitis*), w której zmiany sięgają proksymalnie od zagięcia śledzionowego, często aż do kątnicy [53]. Szczegółowo klasyfikację przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2. Klasyfikacja montrealaska zasięgu choroby**

Zasięg choroby		Anatomia zmian
<b>E1</b>	Wrzodziejące zapalenie odbytnicy	Ograniczone do odbytnicy
<b>E2</b>	Postać lewostronna (dystalna)	Dystalnie od zagięcia śledzionowego
<b>E3</b>	Zapalenie całego jelita grubego ( <i>pancolitis</i> )	Całe jelito grube, w tym proksymalnie od zagięcia śledzionowego

### 1.1.8. Obraz histologiczny

Podstawą rozpoznania WZJG jest ocena histologiczna wycinków błony śluzowej jelita grubego pobranych podczas kolonoskopii. Istnieją pewne cechy histologiczne pozwalające na zróżnicowanie WZJG z zapaleniami jelita o innej etiologii. Często spotykane w praktyce klinicznej wątpliwości dotyczą zróżnicowania zapalenia o etiologii infekcyjnej z nieswoistym procesem zapalnym. Analiza kliniczna nie pozwala też czasem zróżnicować WZJG z chorobą Leśniowskiego-Crohna zlokalizowaną w jelicie grubym – również w tych przypadkach niezbędnym elementem diagnostyki jest ocena histologiczna wycinków. Nie zawsze jednak jednorazowe pobranie wycinków pozwala na jednoznaczne rozpoznanie choroby. Z tego powodu w przypadku rozległych zmian endoskopowych preferowane jest pobieranie licznych wycinków z różnych odcinków jelita oraz ich dokładne opisanie. Ponadto obraz mikroskopowy zależy w dużym stopniu od aktywności choroby (faza zaostrzenia lub faza remisji), przez co pewnych cech charakterystycznych tylko dla ostrego rzutu choroby nie można zaobserwować w okresie poprawy klinicznej. Kolejnym problemem jest niejednorodny obraz histologiczny poszczególnych przypadków choroby. Niektóre cechy bardzo swoiste dla danej choroby nie występują u wszystkich chorych, a więc charakteryzują się stosunkowo niedużą czułością diagnostyczną. Przykładem jest występowanie ziarniniaków w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna, których stwierdzenie pozwala z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić diagnozę [54], jednak częstość ich rozpoznawania w wycinkach endoskopowych nie przekracza 50-60% [50]. Z tych powodów niejednokrotnie postawienie ostatecznego rozpoznania wymaga kilkakrotnego powtarzania badań endoskopowych z pobraniem licznych wycinków. W przypadkach potwierdzenia histologicznego nieswoistego zapalenia jelit, w których jednak zebrany materiał i dane kliniczne nie pozwalają zróżnicować choroby Leśniowskiego-Crohna z WZJG, rozpoznaje się tak zwane *colitis indeterminata*. Początkowo był to termin zarezerwowany dla przypadków choroby przebiegającej burzliwie klinicznie, w których analiza wycinków wykazywała cechy obu chorób. Obecnie jako *colitis indeterminata* najczęściej opisuje się przypadki, w których w dotychczas zebranych materiałach brakuje cech histologicznych różnicujących chorobę

Leśniowskiego-Crohna z WZJG. Zwykle jest to diagnoza tymczasowa, dotycząca około 5- 15% przypadków nieswoistych zapaleń jelit i ostatecznie podczas kolejnych badań udaje się ustalić faktyczne rozpoznanie [15, 55].

Podstawowe elementy analizowane podczas badania histologicznego wycinków błony śluzowej jelita grubego obejmują ocenę nacieku zapalnego blaszki właściwej błony śluzowej, architektoniki błony śluzowej (głównie budowy krypt) oraz rozróżnienie komórek tworzących nacieki zapalne. We WZJG nacieki zapalne blaszki właściwej błony śluzowej jest zwykle rozległy i, w odróżnieniu od zapaleń infekcyjnych, sięga głębokich warstw błony śluzowej. W warstwie podstawnej błony śluzowej często obserwuje się nacieki komórek plazmatycznych [56]. Architektonika krypt jest we WZJG prawie zawsze zaburzona (83- 97% chorych). Choć nie jest to zmiana swoista wyłącznie dla tej choroby, należy do najważniejszych cech pozwalających na postawienie rozpoznania. Zmiany w budowie krypt mogą się także pojawiać w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz w niektórych zapaleniach infekcyjnych, ale w tych schorzeniach występują znacznie rzadziej i są z reguły mniej zaawansowane [57]. Głównymi komórkami tworzącymi nacieki zapalne we WZJG są leukocyty obojętnochłonne (granulocyty obojętnochłonne). Ilość neutrofilów i rozległość nacieku zależą od aktywności choroby. W ostrej fazie WZJG dodatkowo często obserwuje się nacieki zapalne w obrębie zmienionych krypt. Szczególnie w czasie ciężkiego zaostrzenia możliwe jest pojawienie się ropni kryptowych, które są cechą typową dla WZJG. W przypadku remisji klinicznej oraz braku cech aktywnej choroby w obrazie endoskopowym obecność licznych granulocytów obojętnochłonnych w błonie śluzowej wraz z rozlanym naciekiem plazmocytów w okolicy dna krypt mogą świadczyć o zwiększonym ryzyku nawrotu choroby [58]. Wśród dodatkowych cech przemawiających za rozpoznaniem WZJG wymienia się także metaplazję komórek Panetha oraz zmniejszoną produkcję mucyn [55].

Pobieranie wycinków błony śluzowej i ich ocena histologiczna mają dodatkowe, istotne zastosowanie u chorych z już potwierdzonym WZJG. Jest to podstawowa metoda monitorowania jelita pod kątem nowotworzenia. Z uwagi na znacznie podwyższone ryzyko raka jelita grubego u chorych z wieloletnim wywiadem WZJG zaleca się wykonanie pierwszego badania przesiewowego z pobraniem licznych wycinków (tak zwanego mapowania jelita) u wszystkich chorych z zajęciem całego jelita grubego lub jego lewej połowy po 7-8 latach od momentu rozpoznania i powtarzanie kolonoskopii co 1-3 lata. W

przypadku stwierdzenia w badaniu histologicznym zmian nowotworowych lub dysplazji dużego stopnia chorzy są kierowani na kolektomię. Zalecenia postępowania u pacjentów ze stwierdzoną dysplazją małego stopnia są wciąż przedmiotem dyskusji. Koncepcja radykalna zakłada również kolektomię (identycznie jak w przypadku dysplazji dużego stopnia), mniej radykalna – intensyfikację nadzoru onkologicznego i mapowanie jelita grubego co pół roku [59].

#### 1.1.9. Leczenie

Leczenie WZJG opiera się przede wszystkim na przewlekłej farmakoterapii. Dopiero w przypadku stwierdzenia oporności na leczenie lub wystąpienia powikłań (szczególnie raka jelita grubego) stosuje się leczenie chirurgiczne, zwykle proktokolektomię. Wybór optymalnego leczenia farmakologicznego zależy od stanu klinicznego chorego, aktualnej aktywności choroby oraz rozległości zmian w jelicie grubym.

U chorych z wrzodziejącym zapaleniem odbytnicy podstawą leczenia jest stosowanie preparatów mesalazyny doodbytniczo w postaci czopków lub wlewów doodbytniczych w dawce 1g/dobę. Takie postępowanie jest często wystarczające w monoterapii w czasie lekkich lub średnio ciężkich rzutów choroby. Dopiero w przypadku braku poprawy do leczenia zalecane jest dołączenie mesalazyny doustnie lub sterydu w formie doodbytniczej, a gdy takie postępowanie jest nadal nieskuteczne, należy zastosować sterydy systemowe.

W lewostronnej postaci choroby stosuje się pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA: sulfasalazynę lub mesalazynę) przewlekłe w dawce podtrzymującej nie mniejszej niż 2g/dobę doustnie. Takie postępowanie wykazuje skuteczność w podtrzymywaniu remisji klinicznej oraz zmniejsza ryzyko rozwoju raka jelita grubego w dłuższej obserwacji. W okresie zaostrzenia małego lub średniego stopnia zaleca się zwiększenie dawki 5-ASA podawanych doustnie do 5 g/dobę [60]. W przypadku nieosiągnięcia remisji lub ciężkiego rzutu choroby konieczne jest włączenie sterydów systemowych (w formie doustnej lub dożylniej) w schematach zakładających dużą dawkę na początku leczenia i stopniowe jej zmniejszanie w miarę poprawy klinicznej, aż do całkowitego odstawienia po mniej więcej 8 tygodniach.



W przypadku zajęcia całego jelita grubego postępowanie jest podobne jak w postaci lewostronnej. Obejmuje ono leczenie preparatami 5-ASA w formie doustnej i doodbytniczej oraz sterydoterapię systemową.

W niektórych przypadkach choroby spotyka się jednak ciężkie zaostrzenia niepoddające się leczeniu sterydami i wymagające intensywnego leczenia w warunkach szpitalnych. Niezależnie od zakresu zmian chorobowych należy spodziewać się wyraźnego efektu klinicznego po 3 dniach od włączenia systemowej sterydoterapii. Jeżeli poprawa nie następuje, zaleca się włączenie dożylnych preparatów cyklosporyny lub infliximabu (przeciwciała monoklonalne anty-TNF $\alpha$ ) [61]. Brak poprawy w ciągu tygodnia intensywnego leczenia zachowawczego stanowi podstawę do kwalifikowania chorego do leczenia operacyjnego.

W leczeniu przewlekłym istnieją dwa główne cele terapii. Pierwszym jest jak najdłuższe podtrzymywanie remisji klinicznej i zapobieganie zaostrzeniom. Drugim jest prewencja nowotworzenia w obrębie jelita i monitorowanie pod kątem przewlekłych powikłań choroby. Poważny problem stanowią chorzy wymagający przedłużania sterydoterapii systemowej, u których niejednokrotnie ponowne zaostrzenie występuje przy każdej próbie odstawienia glikokortykosteroidu. Są to tak zwani chorzy sterydozależni. Stosunkowo długa ekspozycja na leczenie glikokortykosteroidami stwarza podwyższone ryzyko wystąpienia jatrogennych powikłań. Trudności w leczeniu sprawiają także chorzy nieodpowiadający na włączenie steroidu w czasie zaostrzenia, tak zwani sterydooporni. W tych grupach chorych w leczeniu przewlekłym stosuje się inne niż sterydy leki modulujące czynność układu immunologicznego. Należą do nich: tiopuryny (azatiopryna i 6-merkaptopuryna), inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna A i takrolimus) oraz leki biologiczne (przeciwciała monoklonalne) [62, 63].

Leczenie operacyjne jest konieczne w trybie pilnym u chorych z ciężkim rzutem choroby nieodpowiadającym na intensywną farmakoterapię lub z ostrym powikłaniem. Dodatkowo istnieją wskazania do leczenia chirurgicznego w trybie planowym, obejmujące potwierdzenie w badaniu histopatologicznym zmian przedrakowych lub raka jelita grubego oraz przypadki choroby średnio nasilonej, ale niepoddającej się leczeniu farmakologicznemu. We wszystkich przypadkach kwalifikacji do leczenia chirurgicznego

preferowaną techniką operacyjną jest proktokolektomia z wytworzeniem zbiornika z jelita cienkiego [64].

Leczenie nieswoistych zapaleń jelit jest wciąż przedmiotem wielu badań, które co roku przynoszą nowe możliwości terapeutyczne w tych chorobach. Jednymi z najbardziej obiecujących kierunków są badania nad nowymi lekami biologicznymi. W ostatnim czasie wprowadzono do leczenia nowe przeciwciało monoklonalne – vedolizumab. Lek jest skierowany przeciw molekuł adhezyjnej  $\alpha_4\beta_7$ -integrynie i prawdopodobnie znajdzie zastosowanie głównie w leczeniu WZJG [65]. Innym kierunkiem jest wciąż rozwijana metoda przeszczepiania chorym na WZJG flory jelitowej od zdrowych pacjentów. Ten sposób leczenia ma udowodnione efekty w różnych jednostkach chorobowych, w tym w nawracających zakażeniach bakterią *Clostridium difficile* czy w przewlekłych zaparciach. We WZJG udowodniono skuteczność przeszczepiania bakterii jelitowych zarówno w indukcji remisji, jak i w jej podtrzymywaniu. Metoda ta stwarza też nadzieję dla pacjentów steroidoopornych, u których również opisano pozytywne efekty leczenia [66].

## **1.2. Białka wstrząsu cieplnego 70 (Hsp70)**

### **1.2.1. Białka wstrząsu cieplnego**

Białka wstrząsu cieplnego (heat-shock proteins – Hsp), nazywane także zamiennie *białkami szoku cieplnego*, występują we wszystkich żywych organizmach. Ich obecność stwierdzono zarówno u prostych organizmów jednokomórkowych, jak i wysoko rozwiniętych kręgowców, w tym także u człowieka [67]. Po raz pierwszy obecność genów kodujących Hsp opisano w 1962 roku [68], jednak same białka odkryto w 1974 roku u *Drosophila melanogaster* [69]. Etymologia nazwy *białko szoku cieplnego* (*heat-shock proteins*) wynika z obserwacji, iż ich stężenie rośnie po ekspozycji na stres cieplny. Udowodniono jednak, że Hsp są produkowane także w wielu innych sytuacjach zagrożenia, takich jak: stres oksydacyjny, czynniki chemiczne, biologiczne (np. infekcje wirusowe) i fizyczne (promieniowanie ultrafioletowe), zaburzenia ukrwienia oraz odżywiania [70].

Sprawują wtedy funkcję ochronną komórki przed czynnikami szkodliwymi oraz wspomagają procesy naprawcze uszkodzonych białek [71]. Stąd Hsp bywają nazywane *białkami chaperonowymi*, czyli opiekuńczymi. W przypadku nieodwracalnego uszkodzenia białek, Hsp uczestniczą w usuwaniu uszkodzonych cząsteczek przez proteosomy i lizosomy. W ostatnim czasie w badaniach coraz większy nacisk kładzie się na rolę Hsp w procesach immunologicznych. W chorobach nowotworowych oraz infekcyjnych zaobserwowano ich udział w prezentacji antygenów układowi odpornościowemu. Cząsteczki Hsp przyłączają peptydy pochodzące od nowotworu lub patogenu będącego przyczyną infekcji. Powstające kompleksy peptyd-Hsp są następnie eksponowane na powierzchni komórki przez białka głównego układu zgodności tkankowej I (MHC-I). Antygeny prezentowane przez MHC-I są potem rozpoznawane jako obce przez komórki prezentujące antygen (APC). Proces ten zachodzi dzięki połączeniu związanego z obcym antygenem Hsp i specjalnego receptora na powierzchni APC [72]. W aktualnych badaniach zidentyfikowano kilka receptorów Hsp na komórkach APC oraz potwierdzono eksperymentalnie procesy immunologiczne zachodzące po ich aktywacji [73]. Tym samym odkryto drogę interakcji Hsp z układem immunologicznym. Ostateczne uruchomienie odpowiedzi immunologicznej zachodzi przy udziale komórki APC, która prezentuje antygen limfocytom T i stymuluje je do ostatecznego zniszczenia komórki nowotworowej lub zajętej przez czynnik infekcyjny. Dodatkowo interakcja Hsp z komórkami APC stymuluje wyrzut cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-6) [74].

Przypuszcza się, iż Hsp mogą stanowić ważny element naturalnej obrony organizmu przed uszkodzeniem w mechanizmie autoimmunologicznym. Z tego powodu stają się one istotnym obiektem zainteresowania nauki, zarówno jako element patofizjologii procesów immunologicznych, jak i potencjalny element terapeutyczny chorób z autoagresji. Nie jest to zresztą jedyna grupa chorób, w której zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania Hsp w leczeniu. W onkologii prowadzone są prace nad indywidualnymi szczepionkami przeciwko zmutowanym białkom Hsp charakterystycznym dla danego nowotworu [75]. Ta metoda leczenia jest określana jako czynna swoista immunoterapia szczepionką niekomórkową [76].

Innym mechanizmem interakcji Hsp z układem immunologicznym ludzkiego organizmu jest niekorzystne zjawisko mimikry molekularnej. Jest ono spowodowane podobieństwem budowy cząsteczek Hsp występujących w komórkach patogennych bakterii i białek Hsp człowieka. Z tego powodu może dochodzić do powstania przeciwciał anti-Hsp

sprowokowanego przez infekcję bakteryjną, a prowadzącego do reakcji autoimmunologicznej [77]. Zjawisko takie obserwowano w przebiegu infekcji *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Chlamydia trachomatis*. Patogeny *Chlamydia* prowokują zakażony organizm do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko Hsp60 bakterii, jednak z powodu mimikry molekularnej może dojść do powstania przeciwciał skierowanych przeciw własnemu Hsp, co prowadzi do uruchomienia reakcji autoimmunologicznej [77]. Z kolei białka Hsp70 bakterii *Mycobacterium tuberculosis* stymulują limfocyty T do aktywności. Stymulacja ta może być czynnikiem spustowym procesu autoimmunologicznego w takich chorobach, jak reumatoidalne zapalenie stawów czy stwardnienie rozsiane [78, 79, 80]. Z drugiej strony, proces prowokacji reakcji autoimmunologicznej przez infekcję nie został jeszcze dokładnie stwierdzony, wiele opisanych jej elementów to na razie nieudowodnione w badaniach hipotezy. Istnieją wręcz doniesienia negujące możliwość powstania reakcji autoimmunologicznej na drodze zjawiska mimikry molekularnej [81]. Zagadnienie wciąż budzi więc kontrowersje i wymaga dodatkowych badań.

Hsp podzielono na rodziny zależnie od ich masy cząsteczkowej, co z kolei pociąga za sobą sposób nominacji (przykładowo: rodzina białek o masie cząsteczkowej 70 kDa jest nazywana Hsp70). Białka z danej rodziny mogą pełnić różne funkcje [82]. Wyróżnia się cztery główne rodziny białek Hsp: niskocząsteczkowe sHsp, Hsp60, Hsp70 i Hsp90 [83].

### 1.2.2. Białka szoku cieplnego 70

Rodzina Hsp70 charakteryzuje się wysoce konserwatywną sekwencją aminokwasów – ich budowa wykazuje znaczną homologię pomiędzy organizmami z różnych gatunków, a nawet królestw (np. budowa białek Hsp70 u prokariota jest w 50% identyczna, jak u eukariota) [82]. Do tej pory w ludzkim genomie zidentyfikowano 12 genów kodujących 14 białek z rodziny Hsp70 [84]. Także w obrębie rodziny białka te wykazują znaczną homologię budowy, różnią się jednak pełnioną funkcją, lokalizacją w narządach i w obrębie komórki oraz dynamiką ekspresji zależną od bodźców stresowych [82]. W budowie molekularnej białek Hsp70 wyróżnia się trzy domeny, przy czym nie ma wyjaśniono dotąd roli środkowej z

nich. Domena N-terminalna pełni funkcję ATP-azy, a część C-terminalna jest domeną wiążącą substrat i zarazem najmniej konserwatywną strukturą białek Hsp [85, 86].

Spośród wszystkich 14 białek z rodziny Hsp70 najlepiej poznano dwie grupy – Hsp72 i Hsp73. Hsp72 to dwa białka o niemal identycznej budowie (różnią się jedynie 2 aminokwasami) i funkcji, traktowane przez to często jako jedna grupa. Są one również nazywane białkami Hsp70 (ta uproszczona nazwa będzie stosowana w niniejszej pracy przy opisie badania własnego) lub rozdzielnie Hsp70-1 i Hsp70-2 oraz kodowane przez geny odpowiednio HSPA1A i HSPA1B. Jest to główna grupa białek odpowiadająca dynamicznym wzrostem ekspresji na czynniki stresowe. Białko Hsp73, nazywane także białkiem Hsc70 (ta nazwa będzie stosowana w dalszej części pracy podczas opisu badania własnego) lub Hsc73 (*heat shock cognate protein*) jest kodowane przez gen HSPA8. Wykazuje ono 85% homologię budowy w stosunku do Hsp72, jednak znacznie różni się od niego funkcją. Jego ekspresja jest niezależna od czynników stresowych. Jest to białko o konstytutywnej ekspresji we wszystkich komórkach organizmu [82].

Za charakterystyczną zmienność ekspresji Hsp70 zależnie od bodźców stresowych odpowiadają cztery czynniki transkrypcyjne: HSF1, HSF2, HSF3, HSF4 (*heat shock transcription factor*) [87]. Najlepiej poznanym i opisanym jest HSF1, który w stabilnych warunkach jest związany z białkami Hsp70 i Hsp90 jako nieaktywny monomer. W sytuacji stresu komórkowego białka Hsp70 uwalniają połączony z nimi HSF1, aby związać się z uszkodzonymi białkami i pełnić swoje funkcje chaperonowe. HSF ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie rozpoznaje sekwencję DNA zwaną HSE (*heat shock promotor element*) i wiąże się z nią [88]. Następuje aktywacja genów kodujących Hsp i ich zwiększona synteza. Po ustąpieniu stresu komórkowego HSF ponownie wiąże się z białkami Hsp70 oraz z białkiem wiążącym HSF1 (HSBP1) [72].

Białka Hsp70 ogrywają istotną rolę w przebiegu wielu chorób. W niektórych przypadkach biorą udział w ich patogenezie, w innych sytuacjach klinicznych z kolei stanowią czynnik protekcyjny przed zachorowaniem. Dobrze opisano i zbadano eksperymentalnie rolę Hsp70 w reumatoidalnym zapaleniu stawów. W przebiegu choroby obserwowane jest pojawianie się przeciwciał anti-Hsp70 w surowicy oraz w płynie maziowym [89]. Wzrost ekspresji Hsp70 wiąże się również z efektem przeciwzapalnym, ponieważ zmniejsza stężenie

cytokin prozapalnych (IL-6, IL-8), natomiast stymuluje wydzielanie przeciwzapalnej IL-10 [90, 91]. W badaniach naukowych z zakresu neurologii zwrócono uwagę na istotną rolę białek Hsp także w chorobach neurodegeneracyjnych. W stwardnieniu rozsianym Hsp70 prawdopodobnie hamują mobilizację komórek NK, zmniejszając przez to aktywność choroby [92]. W niektórych okolicach mózgu u chorych na chorobę Alzheimera odkryto obniżoną ekspresję genów kodujących Hsp (HSPA8 i HSPA9) [93]. Udowodniono również, iż Hsp70 hamują tworzenie złogów amyloidu w tkance mózgowej, będącej podstawą patogenezy choroby Alzheimera. Hsp70 prawdopodobnie hamuje także agregację  $\alpha$ -synukleiny – białka odgrywającego główną rolę w rozwoju choroby Parkinsona, otępieniu z ciałami Lewy’ego oraz zaniku wieloukładowym [94]. Obecnie metody stymulacji ekspresji Hsp70 lub podawania ich egzogennie są w centrum zainteresowania badaczy poszukujących nowych możliwości terapeutycznych zespołów otępiennych [95]. Białka Hsp70 są również przedmiotem badań nad chorobami nerek. Stężenie Hsp70 w moczu oraz anty-Hsp70 w surowicy może być dobrym markerem aktywności choroby u pacjentów z przewlekłym zapaleniem kłębuszków nerkowych [96]. Prawdopodobnie białka Hsp70 biorą także udział w patogenezie odpowiedzi autoimmunologicznej w kłębuszkowych zapaleniach nerek oraz nefropatii toczniowej [97]. Z kolei u chorych z przewlekłą chorobą nerek Hsp70 wraz z Hsp60 mogą być czynnikami przyspieszającymi progresję miażdżycy [98].

### **1.3. Rola białek Hsp70 w procesie chorobowym wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

#### **1.3.1. Lokalizacja i ekspresja białek Hsp70 w jelicie grubym**

Lokalizacja białek z rodziny Hsp70 w przewodzie pokarmowym jest bardzo zróżnicowana. Białko Hsc73 wykazuje stałą ekspresję we wszystkich częściach przewodu pokarmowego. Ekspresja ta nie ulega też zmianie pod wpływem czynników stresowych czy środowiskowych. Z kolei białko Hsp72 należy do grupy białek, których ekspresja jest indukowana czynnikami stresowymi [82]. Przez pewien czas od jego odkrycia uważano nawet, iż nie występuje ono w ogóle w warunkach homeostazy, bez jakichkolwiek bodźców

stresowych. Wykazano jednak, iż w niektórych fragmentach przewodu pokarmowego nawet niepoddawanych stanom zagrożenia, występuje pewna, niewielka ekspresja Hsp72, która znacząco rośnie po zadziałaniu czynników stresowych. Są to okolice żołądka, najbardziej dystalny odcinek jelita cienkiego (tak zwane *ileum terminale*) oraz jelito grube [99]. Przyczyną tego zjawiska nierównomiernej podstawowej ekspresji Hsp72 jest prawdopodobnie działanie pewnych czynników stale stymulujących produkcję białka właśnie w tych fragmentach przewodu pokarmowego. W przypadku żołądka jest to kwaśne pH oraz ciągłe drażnienie mechaniczne błony śluzowej przez pokarm. W jelicie grubym stałą produkcję białek Hsp72 stymuluje fizjologiczna flora bakteryjna. Bakterie komensalne z okrężnicy często migrują wstecznie przez zastawkę Bauhina i są obecne w *ileum terminale*, dlatego jest to jedyna część jelita cienkiego z podstawową ekspresją Hsp72 [100].

W jelicie grubym niepoddawany czynnikom stresowym ekspresja białek Hsp72 wykazuje wyraźną zależność od odległości od światła okrężnicy. W głębszych warstwach błony śluzowej, jak blaszka właściwa, nie obserwuje się ich w ogóle, w niewielkim stężeniu występują w komórkach górnych części krypt jelitowych, a największą koncentrację można stwierdzić w komórkach nabłonka przy samym świetle jelita grubego [99, 101]. Takie rozmieszczenie białek Hsp72 odpowiada funkcji, jaką sprawują – roli cytoprotekcyjnej w komórkach nabłonka najbardziej narażonych na zewnętrzne czynniki uszkodzające [100].

Flora bakteryjna jelita grubego jest uważana, jak już powyżej wspomniano, za główny czynnik stymulujący podstawową ekspresję Hsp72 w błonie śluzowej. Być może jest to jeden z mechanizmów odpowiadających za obserwowany klinicznie silny związek bakterii komensalnych z homeostazą jelita grubego. Zachwianie tej równowagi leży u podstaw patogenezy wielu chorób przewodu pokarmowego, w tym jest również uważane za jedną z przyczyn rozwoju nieswoistych zapaleń jelit. W ostatnich latach przedmiotem wielu badań był wpływ konkretnych bakterii występujących w jelicie grubym na ekspresję białek Hsp. Działanie stymulujące produkcję Hsp72 wykazują między innymi rozpuszczalne cząsteczki *Lactobacillus GG* [102]. Ważną rolę w utrzymaniu podstawowego stężenia Hsp72 odgrywają również *Bacteroides fragilis* – jedne z głównych szczepów komensalnych bakterii beztlenowych. Za efekt pobudzający ekspresję Hsp odpowiadają prawdopodobnie bakteryjne lipopolisacharydy. Stymulującego działania *Bacteroides fragilis* nie wykazano wobec ekspresji cząsteczek Hsc73, których stężenie wydaje się niezależne od obecności

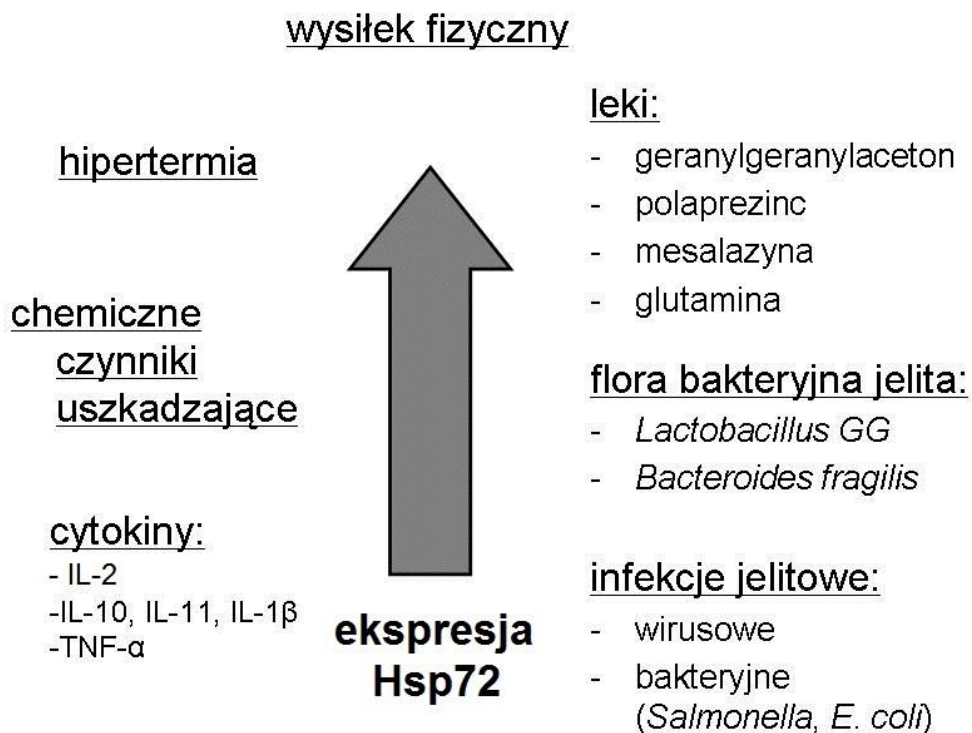
poszczególnych szczepów bakteryjnych w świetle jelita [99]. Flora bakteryjna jelita grubego w warunkach fizjologicznych nie przenika proksymalnie do jelita cienkiego, z wyjątkiem wspomnianego już końcowego odcinka jelita krętego (*ileum terminale*). Udowodniono jednak, że także w nabłonku pozostałych części jelita cienkiego (jelicie krętym, czczym i w dwunastnicy), w przypadku pojawienia się w nich szczepów enterobakterii komensalnych, może pojawić się charakterystyczna podstawowa ekspresja Hsp72. Białka te pełnią wtedy funkcję chaperonową zgodnie ze swoją rolą w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego [100]. Nie tylko fizjologiczna flora bakteryjna stymuluje produkcję białek Hsp72. Podobne właściwości wykazuje również wiele patogennych szczepów bakteryjnych, jak *Salmonella enteritidis* czy *Escherichia coli* [103, 104]. O decydującej roli flory bakteryjnej, głównie beztlenowej, dla podstawowej ekspresji Hsp72 w błonie śluzowej jelita grubego świadczą również zmiany stężenia tych białek obserwowane pod wpływem farmakoterapii. W przebiegu stosowania ogólnoustrojowo metronidazolu (chemioterapeutyku szczególnie aktywnego wobec bakterii beztlenowych) ekspresja Hsp72 znacznie spada. Takie działanie wydaje się jednak dość specyficzne dla danego leku, ponieważ podobnego oddziaływania nie wykazano dla ciprofloksacyny – szerokospektralnego antybiotyku o dużym wpływie na biotop jelita grubego [104, 105].

Drugim istotnym elementem odpowiedzialnym za podstawową ekspresję Hsp72 w błonie śluzowej jelita grubego jest działanie układu immunologicznego. Obecność limfocytów i produkowanych przez nie cytokin jest prawdopodobnie niezbędna do ekspresji Hsp72. W modelu eksperymentalnym zwierzęta laboratoryjne pozbawione limfocytów wykazywały znamienne niższą produkcję Hsp niż grupa posiadająca limfocyty. Najistotniejsze znaczenie ma interleukina 2 (IL-2) produkowana przez limfocyty blaszki właściwej błony śluzowej. Prawdopodobnie nie jest to jednak jedyna cytokina stymulująca ekspresję Hsp72, gdyż podstawową ekspresję tego białka obserwuje się także w błonie śluzowej, w której limfocyty nie produkują IL-2. Efekt indukcji białek Hsp wykazują także inne cytokiny (IL-10, IL-11, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), jednak dotyczy on głównie rodziny Hsp25, bez wpływu na Hsp72. Ekspresja białka Hsc73 pozostaje – zgodnie z jego konstytutywnymi właściwościami – niezależna od układu immunologicznego [99, 105].

Prawdopodobnie innym fizjologicznym czynnikiem zwiększającym ekspresję Hsp72 może być aktywność fizyczna [106]. Możliwe, że jest to jeden z mechanizmów, poprzez które



wysiłek fizyczny korzystnie wpływa na przebieg kliniczny procesów zapalnych, w tym nieswoistych zapaleń jelit [107]. Do tej pory nie udowodniono eksperymentalnie hipotezy stymulacji ekspresji Hsp72 w jelicie grubym pod wpływem aktywności fizycznej. Ostatnie badania potwierdzają natomiast wzrost stężenia Hsp72 w obrębie serca i mięśni szkieletowych w wyniku wysiłku fizycznego [108, 109]. Jest to zjawisko korzystne, pełniące funkcję kardioprotekcyjną [110]. Czynniki prowokujące wzrost ekspresji białka Hsp72 zebrano na rycinie nr 3.



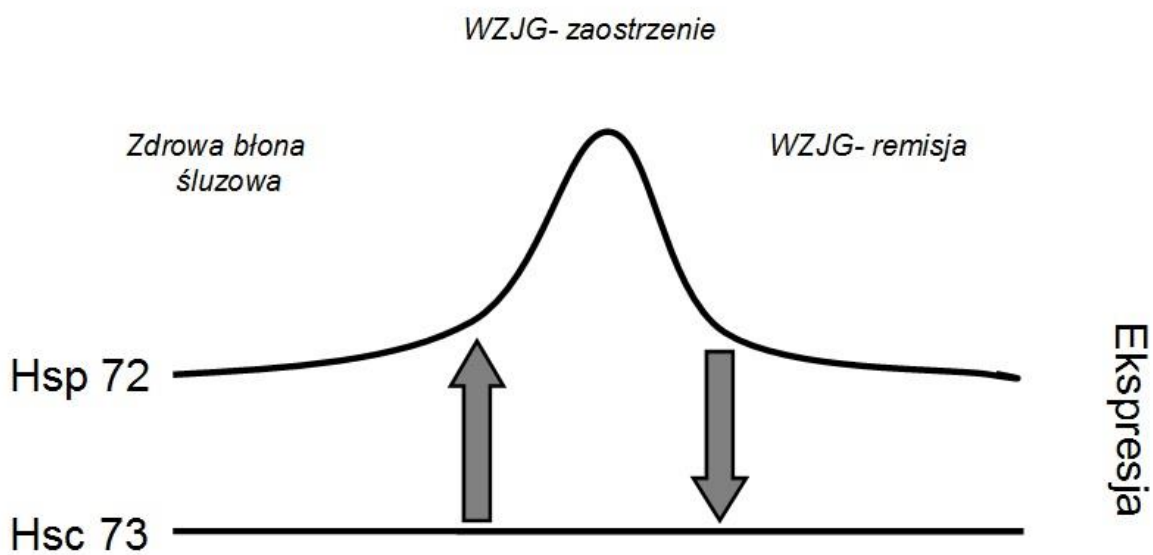
**Rycina 3. Czynniki stymulujące wzrost ekspresji białka Hsp72 w błonie śluzowej jelita grubego**

### 1.3.2. Ekspresja i rola białek Hsp72 w procesie chorobowym WZJG

W nieswoistych chorobach zapalnych jelit ekspresja niektórych białek Hsp jest istotnie wyższa niż w zdrowej populacji. Ta właściwość dotyczy rodziny białek Hsp70 oraz

Hsp 40. Nie obserwuje się natomiast wzrostu ekspresji protein z rodzin Hsp25, Hsp32 i Hsp90 pod wpływem stanu zapalnego w jelicie [111]. W badaniach eksperymentalnych indukcja syntezy białek Hsp70 w przebiegu zapaleń jelit wywoływanych farmakologicznie dotyczy przede wszystkim Hsp72 i jest obserwowana w błonie śluzowej jelita grubego. Proces chorobowy nie wpływa natomiast na stałe stężenie Hsc73 w blaszce właściwej błony śluzowej [112]. Istotnie wyższe niż w zdrowej populacji stężenia Hsp72 w błonie śluzowej jelita grubego obserwuje się u chorych na nieswoiste zapalenia jelit, jak również u pacjentów z infekcjami jelitowymi. Ekspresja białek Hsp72 nie różnicuje więc etiologii zapalenia, jakkolwiek u chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna czy WZJG jest istotnie wyższa niż w zapaleniach infekcyjnych. Wyższe stężenia Hsp72 u chorych na WZJG obserwuje się nie tylko w błonie śluzowej z cechami endoskopowymi aktywności choroby, ale także w błonie śluzowej jelita niezmienionej makroskopowo [113].

Wysoka ekspresja białek Hsp70 jest jednak charakterystyczna dla aktywnej fazy nieswoistych chorób zapalnych jelit. Pod wpływem skutecznego leczenia, ocenianego na podstawie poprawy klinicznej oraz endoskopowej chorych, obserwuje się również spadek stężenia Hsp72 w błonie śluzowej. Istnieją doniesienia sugerujące możliwość całkowitej normalizacji ekspresji Hsp72 w okresie remisji nieswoistych zapaleń jelit [112]. Istnieje więc pewna niewyjaśniona do tej pory sprzeczność wyników niektórych badań. Z drugiej strony bowiem, część doniesień dowodzi stałego podwyższenia stężenia białek Hsp72 w błonie śluzowej u chorych na nieswoiste zapalenia jelit pozostających w remisji, w porównaniu ze zdrową populacją [113]. Zmiany ekspresji białka Hsp72 w błonie śluzowej jelita zależnie od aktywności WZJG przedstawiono na rycinie 4.



**Rycina 4. Zmiany ekspresji białka Hsp72 oraz Hsc73 w błonie śluzowej jelita zależnie od aktywności WZJG**

Przypuszcza się, iż stała ekspresja białek Hsp w błonie śluzowej jelita grubego jest elementem naturalnej ochrony organizmu przed zapaleniami jelit. Odkryto bowiem, iż indukcja ekspresji białek z rodzin Hsp40, Hsp70 i Hsp90 przed zadziałaniem czynników uszkadzających błonę śluzową przewodu pokarmowego, zmniejsza ryzyko zachorowania na zapalenie jelita grubego [111, 114].

### 1.3.3. Wpływ farmakoterapii na stężenie Hsp72

Wyraźny związek ekspresji białek Hsp70 w nabłonku jelita ze zdolnością do ochrony przed czynnikami szkodliwymi stwarza nowe możliwości terapeutyczne w chorobach jelit.

Zgodnie z opisanymi wcześniej obserwacjami ewentualne farmakologiczne zwiększenie ekspresji Hsp70 mogłoby wywrzeć korzystny wpływ na przebieg choroby, a nawet zapobiegać nieswoistym zapaleniom jelit. Takie działanie wykazuje geranylgeranylaceton – substancja o udowodnionych eksperymentalnie właściwościach zwiększających ekspresję Hsp70 w błonie śluzowej jelita. Zjawisko to przekłada się z kolei na lżejszy przebieg choroby, a nawet zapobiega zapaleniu jelita grubego indukowanemu czynnikami chemicznymi [115, 116]. Inną substancją stymulującą ekspresję Hsp70 jest polaprezinc. Ten związek chemiczny cynku i L-karnozyny wykazuje właściwości przeciwnowotworowe oraz antyoksydacyjne. Podany w odpowiednim czasie przed chemicznym uszkodzeniem jelita grubego pozwala zapobiec powstaniu stanu zapalnego. Obserwuje się przy tym wyraźny wzrost ekspresji Hsp70 [117]. Dodatkowo stwierdzono, że podanie quercetyny (substancji hamującej ekspresję Hsp70) niweluje działanie przeciwzapalne polaprezyncu [118]. Udowodniono także działanie protekcyjne polaprezyncu w podobnym mechanizmie w przypadku narażenia jelita cienkiego na uszkodzenie kwasem acetylosalicylowym [119].

Lekiem od lat szeroko stosowanym w terapii nieswoistych zapaleń jelit jest mesalazyna. Substancja ta również wywiera wpływ na ekspresję Hsp70, jednak nie w sposób bezpośredni – samo zastosowanie mesalazyny nie zwiększa bowiem ekspresji Hsp w komórkach nabłonka jelita grubego. Jednak kiedy po podaniu leku następuje ekspozycja na hipertermię, mesalazyna potęguje wpływ wysokiej temperatury na zwiększenie ekspresji Hsp70 [120]. Tym samym pozwala osiągnąć lepszy efekt ochronny przed stresem oksydacyjnym. Efekt taki w eksperymentalnym zapaleniu jelita grubego wykazuje również glutamina podawana w wysokich dawkach. Zaobserwowano, iż mechanizm tego działania protekcyjnego opiera się prawdopodobnie na wzroście stężenia białek Hsp70 i Hsp25, obserwowanym po podaniu substancji [121].

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA

Białka szoku cieplnego, w tym rodzina białek Hsp70, są znane od bardzo dawna jako białka opiekuńcze, a więc sprawujące w tkankach funkcję ochronną oraz naprawczą w sytuacjach stresowych. W ostatnich latach zainteresowanie budzi także ich rola w patogenezie chorób z autoagresji, w tym również we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Najlepiej opisanym białkiem z tej rodziny jest Hsp72, zwane także Hsp70. Jego ekspresja zmienia się w tkankach dynamicznie, zależnie od obecności czynników stresowych. Kolejnym, dobrze znanym białkiem z rodziny Hsp70, jest Hsc73, zwane też Hsc70, którego ekspresja jest opisywana od dawna jako niezmienna pod wpływem stresu. W ostatnich latach dotychczasowa wiedza na temat tych, znanych od dziesięcioleci, białek została znacznie poszerzona. W dziedzinie gastroenterologii pewne zainteresowanie wzbudza ostatnio rola białek Hsp70 i, w nieco mniejszym stopniu, Hsc70 w procesie chorobowym nieswoistych zapaleń jelit, w tym WZJG. Pojawiają się przypuszczenia, że dokładne poznanie mechanizmów regulujących ekspresję białek z rodziny Hsp w błonie śluzowej jelita grubego oraz ich wpływu na przebieg tych schorzeń może stać się podstawą nowych działań terapeutycznych. Liczba dostępnych obecnie publikacji na temat roli białek z rodziny Hsp70 w procesie chorobowym WZJG jest jednak wciąż niedostateczna, a wyniki najnowszych badań nie zawsze są ze sobą zgodne. Niniejsza rozprawa wpisuje się w ciąg prac na ten temat.

Cele badania:

- 2.1. Ocena ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego u pacjentów z WZJG, a następnie porównanie ze zdrową populacją
- 2.2. Ocena korelacji ekspresji Hsp70 i Hsc70 z aktywnością i zasięgiem procesu zapalnego WZJG:
  - porównanie ekspresji u chorych z różną aktywnością choroby według skali montrealskiej;

- porównanie ekspresji u chorych z różnym zasięgiem choroby według skali montrealskiej;
- porównanie ekspresji u chorych z ostrym rzutem choroby z ekspresją u chorych w okresie remisji.

2.3. Zbadanie korelacji stopnia ekspresji Hsp70 i Hsc70 z występowaniem autooprzeciwciał obserwowanych w przebiegu WZJG oraz ze wskaźnikami stanu zapalnego (wskaźniki ostrej fazy, leukocytoza).

2.4. Analiza występowania autooprzeciwciał pANCA i GAB u chorych na WZJG oraz ich ewentualnych korelacji z aktywnością i zasięgiem choroby, ocenianymi według skali montrealskiej.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał

Grupę osób poddanych badaniu stanowiło 72 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2015. Grupę tę podzielono na dwie, zgodne pod względem liczebności, podgrupy. Pierwszą z nich, zwaną dalej grupą badaną, stanowiło 36 chorych z potwierdzonym klinicznie WZJG. Podgrupę drugą, zwaną dalej grupą kontrolną, tworzyło 36 pacjentów z wykluczonym nieswoistym zapaleniem jelit. Parametry socjologiczne osób objętych badaniem obrazuje tabela 3.

**Tabela 3. Charakterystyka liczebności badanych grup pacjentów z uwzględnieniem płci**

Liczba pacjentów	72
Płeć (M:K)	48:24
Wiek	18 -78 lat
Grupa badana (WZJG)	36 (24 M, 12 K)
Grupa kontrolna	36 (24 M, 12 K)

**K – kobiety, M – mężczyźni**

### 3.1.1. Grupa badana

Do grupy badanej retrospektywnie włączono chorych hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2011-2015 z powodu WZJG. Część tych osób miała wieloletni wywiad chorobowy, u innych choroba została świeżo zdiagnozowana. U wszystkich pacjentów w trakcie ich pobytu w szpitalu przeprowadzono dokładny wywiad lekarski oraz badanie przedmiotowe. Zależnie od sytuacji klinicznej diagnostykę rozszerzono o badania laboratoryjne, obrazowe i/lub endoskopowe. W grupie badanej znalazło się 24 mężczyzn i 12 kobiet. Chorzy mieli od 21 do 67 lat, średnia wieku wynosiła 36,5 lat. Aktywność choroby u każdego pacjenta określono na podstawie klasyfikacji montrealskiej. U 20 chorych w momencie hospitalizacji stwierdzono ostry rzut choroby wymagający zastosowania sterydoterapii systemowej. Pozostali pacjenci byli badani w okresie remisji, wszyscy poza jednym chorym otrzymywali leczenie stałymi dawkami mesalazyny. Jeden pacjent nie przyjmował preparatów 5-ASA z powodu stwierdzonej w wywiadzie nietolerancji. Część chorych w okresie remisji otrzymywała również podtrzymującą dawkę glikokortykosteroidów. Nadto, w przypadku potwierdzenia niedoborów elektrolitowych, pierwiastków mineralnych lub witamin, chorym uzupełniano te substancje w postaci leków i suplementów diety. 34 pacjentów miało wykonane oznaczenie przeciwciał w surowicy za pomocą panelu jelitowego CIBD firmy Euroimmun. Wszystkim chorym w trakcie hospitalizacji wykonano badania endoskopowe jelita grubego (kolonoskopię lub rektoskopię) z pobraniem wycinków błony śluzowej, które następnie przekazano do badania histologicznego w Katedrze Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Większość badań endoskopowych została wykonana przez autora rozprawy. Zasięg zmian chorobowych według skali montrealskiej u wszystkich chorych został ustalony na podstawie wyników badań endoskopowych lub obrazowych (wlewu kontrastowego jelita grubego, tomografii komputerowej z programem wirtualnej kolonoskopii).

Kryteria włączenia osób do badania obejmowały: pewną diagnozę kliniczną WZJG, brak współistniejących zapaleń jelit (na przykład o etiologii infekcyjnej), wykluczenie



występowania raka jelita grubego w momencie badania oraz w historii choroby, wykluczenie chorób reumatycznych o podłożu zapalnym (chorób układowych tkanki łącznej, spondyloartropatii), wiek  $\geq 18$  lat. Chorzy byli włączani do grupy badanej niezależnie od aktualnie stosowanego leczenia oraz długości wywiadu chorobowego.

### 3.1.2. Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej zaliczono retrospektywnie pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2013 z powodu bólów brzucha i biegunki celem diagnostyki. U wszystkich w trakcie hospitalizacji przeprowadzono dokładny wywiad lekarski oraz badanie przedmiotowe. Zależnie od sytuacji klinicznej diagnostykę poszerzono o badania laboratoryjne, obrazowe i/lub endoskopowe. Grupa objęła 24 mężczyzn i 12 kobiet w wieku 18- 78 lat, średni wiek wynosił 51,5 roku. Wszyscy mieli wykonane badania endoskopowe jelita grubego (kolonoskopię lub rektoskopię), w których nie uwidoczniono makroskopowych zmian. Większość badań endoskopowych wykonał autor przedstawianej pracy. Z uwagi na wywiad i zgłaszane dolegliwości u wszystkich pacjentów zostały pobrane bioptaty błony śluzowej w celu weryfikacji podejrzenia mikroskopowego zapalenia jelit. Wycinki poddano ocenie histologicznej w Katedrze Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i wykluczono nieswoiste zapalenia jelit, w tym mikroskopowe zapalenia jelit, jako przyczynę diagnozowanych dolegliwości.

Kryteria włączenia osób do grupy kontrolnej obejmowały: wykluczenie nieswoistych zapaleń jelit oraz chorób nowotworowych jelita grubego na podstawie obrazu klinicznego oraz badań dodatkowych, w tym badań endoskopowych z pobraniem bioptatu jelita grubego, wykluczenie chorób reumatycznych o podłożu zapalnym (chorób układowych tkanki łącznej, spondyloartropatii) oraz wiek  $\geq 18$  lat.

### 3.1.3. Materiał tkankowy

Materiał tkankowy stanowiły biopaty błony śluzowej jelita grubego pobrane podczas diagnostyki pacjentów, co opisano powyżej. Do badania wykorzystano archiwalne preparaty tych biopatów, zabezpieczone w Katedrze Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Tkanki były standardowo utrwalane roztworem 4% formaldehydu, a następnie zatopione w parafinie i pocięte na skrawki. Następnie skrawki te zostały zabarwione hematoksyliną i eozyną (standardowa metoda H+E) i ocenione przez patomorfologa doświadczonego w diagnostyce chorób przewodu pokarmowego. W przypadku 3 chorych wykorzystano materiał operacyjny. Byli to chorzy z ciężkim przebiegiem WZJG, niereagującym na leczenie farmakologiczne, w związku z czym zostali zakwalifikowani do leczenia chirurgicznego i przeżyli zabieg proktokolektomii.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Oznaczenia autoprzeciwciał obserwowanych w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit

Oznaczenia przeciwciał w surowicy pacjentów z grupy badanej zostały wykonane w Katedrze Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik – prof. dr hab. Grzegorz Dworacki). Do badania zastosowano profil przeciwciał CIBD firmy Euroimmun. Przeciwciała oceniano metodą immunofluorescencji pośredniej. Profil przeciwciał wykrywa cztery ich rodzaje: przeciw cytoplazmie neutrofilów z okołojądrowym typem świecenia (pANCA) i przeciw komórkom kubkowym jelita (GAB) – swoiste dla WZJG – oraz przeciw *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) i przeciw części zewnątrzwydzielniczej trzustki (PAB) – swoiste dla choroby Leśniowskiego-Crohna. Substraty zastosowane w profilu jelitowym do wykrywania poszczególnych przeciwciał wymieniono w tabeli 4.

**Tabela 4. Substraty zastosowane w profilu jelitowym**

<b>Przeciwciała</b>	<b>Zastosowany substrat</b>	<b>Diagnoza</b>	<b>Czułość</b>	<b>Swoistość</b>
<b>PAB</b>	ag rPAg1 (CUZD1)	CHLC	40%	95%
	ag rPAg2 (GP2)			
<b>pANCA</b>	granulocyty (EOH)	WZJG	45- 80%	90%
	granulocyty (LFS)			
<b>GAB</b>	komórki kubkowe jelita	WZJG	30%	95%
<b>ASCA</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHLC	50- 80%	90%

**pANCA** – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów z okołojądrowym typem świecenia, **GAB** – przeciwciała przeciw komórkom kubkowym jelita; **ASCA** – przeciwciała przeciw *Saccharomyces cerevisiae*; **PAB** – przeciwciała przeciw części zewnątrzwydzielniczej trzustki; **CHLC** – choroba Leśniowskiego-Crohna.

### 3.2.2. Ekspresja Hsp70 i Hsc70

Do oceny ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 zastosowano archiwalny materiał Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (opis powyżej – podrozdział 3.1.3. Materiał tkankowy). Badane tkanki utrwalone w

4% buforowanej formalinie i zatopione w parafinie były cięte na 4 mikrometrowe skrawki i osadzone na szkiełkach z powłoką adhezyjną – SuperFrost®plus (Menzel Gläser). Deparafinizację, proces uwadniania i odkrywanie epitopów przeprowadzono w łaźni wodnej – PT LINK (Dako) w temp. 97°C (20 min) w buforze – Low pH Envision Flex Target Retrieval Solution (Dako). W dalszym etapie analizy, po 10-minutowej inkubacji w Wash Buffer (Dako), skrawki były barwione maszynowo (zastosowano aparat Autostainer Link 48 (Dako)) z wykorzystaniem zestawu wizualizacyjnego do barwień immunohistochemicznych – EnVision Flex Mini Kit, High pH (Link) (Dako, cat. No K8023). Do badania ekspresji przeciwciał Hsp70 użyto monoklonalnych przeciwciał mysich klasy IgG1 (Hsp70 Antibody (4E7), Novus Biologicals, rozcieńczenie 1:1000, cat. NBP1-04300). Do oznaczenia ekspresji Hsc70 zastosowano monoklonalne przeciwciała mysie klasy IgG2ak (Hsc70 Antibody (1F2-H5), Novus Biologicals, rozcieńczenie 1:150, cat. NBP2-12880-200). Wizualizacja reakcji barwnej odbywała się za pomocą 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB). Skrawki były też podbarwiane hematoksyliną Mayera, potem odwadniane i zamykane szkiełkiem nakrywkowym za pomocą DPX.

Po barwieniu preparaty oglądało niezależnie dwóch histopatologów doświadczonych w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit oraz w ocenie materiału barwionego metodą immunohistochemiczną. Ekspresję badanych białek oceniano pod mikroskopem świetlnym na podstawie odsetka komórek z pozytywnym barwieniem wg czterostopniowej skali (0- 3). Punktację 1 przyznawano, gdy ilość wybarwionych komórek wynosiła od 1 do 30% w polu widzenia, 2- gdy ilość ta wynosiła między 31 a 60%, 3- w przypadkach pozytywnego barwienia powyżej 60% komórek.

### 3.2.3. Statystyka

Wyniki statystyki opisowej, to jest wartości średnie, odchylenia standardowe, mediany oraz kwartyle (Q25 i Q75) dla analizowanych cech, takich jak: skala montrealaska zasięgu, skala montrealaska aktywności, przeciwciała GAB, Hsp70 w komórkach nabłonkowych, Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego, Hsc70 w komórkach nabłonka,

Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego oraz CRP, OB, WBC przedstawiono w tabelach oraz na wykresach dla grup badanej i kontrolnej.

Porównania wartości tych cech między grupami wykonano testem Mann'a-Whitney'a.

Wyniki Hsp70 w komórkach nabłonka i Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego oraz Hsc70 w komórkach nabłonka i Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego porównano testem Wilcoxon.

Analizę zależności między cechami badano za pomocą korelacji rangowej Spearman'a.

Poziom istotności  $p < 0,05$  przyjęto jako istotny statystycznie.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica PL v. 10 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

#### 3.2.4. Zgoda komisji bioetycznej

Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (wniosek KB155/13).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka badanej populacji

Grupę badaną – jak wcześniej wspomniano – stanowili pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5. Charakterystyka kliniczna grupy badanej**

<b>Charakterystyka</b>	<b>Grupa badana (n = 36)</b>
<b>Wiek (lata)</b> Średnia ± SD	36,5 ± 14
<b>Płeć (ilość mężczyzn / ilość kobiet)</b>	24 / 12
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> Średnia ± SD	23,21 ± 4,06
<b>Częstość pracy serca (liczba uderzeń / minutę)</b> Średnia ± SD	72 ± 12
<b>CRP (mg/dl)</b> Średnia ± SD	11,17 ± 18,8
<b>OB (mm/h)</b> Średnia ± SD	15 ± 14
<b>WBC (K/μl)</b> Średnia ± SD	8,38 ± 3,85
<b>Aktywność choroby wg skali montrealskiej</b> 0 (liczba chorych) 1 (liczba chorych)	16 3

2 (liczba chorych)	6
3 (liczba chorych)	11
Suma chorych z ostrym rzutem choroby (1, 2 i 3)	20
<b>Zasięg choroby wg skali montrealskiej</b>	
1 (liczba chorych)	3
2 (liczba chorych)	10
3 (liczba chorych)	22
<b>Czas trwania choroby (lata)</b>	
Średnia ± SD	5 ± 6

#### 4.2. Porównanie ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z grupą kontrolną

W grupach badanej i kontrolnej ekspresję białek Hsp70 i Hsc70 po barwieniu metodą immunohistochemiczną z odpowiednimi przeciwciałami oceniano w obrazie mikroskopowym w skali półilościowej (dokładny opis w rozdziale 3.2. Metody) w dwóch populacjach komórek – w komórkach nabłonka jelita grubego oraz w komórkach nacieku zapalnego. Wyniki oceny przedstawiono w tabelach 6. i 7.

**Tabela 6. Ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego w grupie badanej**

Grupa badana	Średnia	N	SD	Q25	Mediana	Q75	Poziom istotności test Wilcoxona
Hsp70 nabł.	<b>2,44</b>	36	0,73	2,00	3,00	3,00	p <0,0001
Hsp70 nac.	<b>1,17</b>	36	0,65	1,00	1,00	1,50	
Hsc70 nabł.	<b>2,11</b>	36	0,92	1,50	2,00	3,00	p <0,0001
Hsc70 nac.	<b>1,08</b>	36	0,73	1,00	1,00	2,00	

n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; Q25 – pierwszy kwartył; Q75 – trzeci kwartył; Hsp70 nabł. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; Hsp70 nac. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; Hsc70 nabł. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; Hsc70 nac. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego

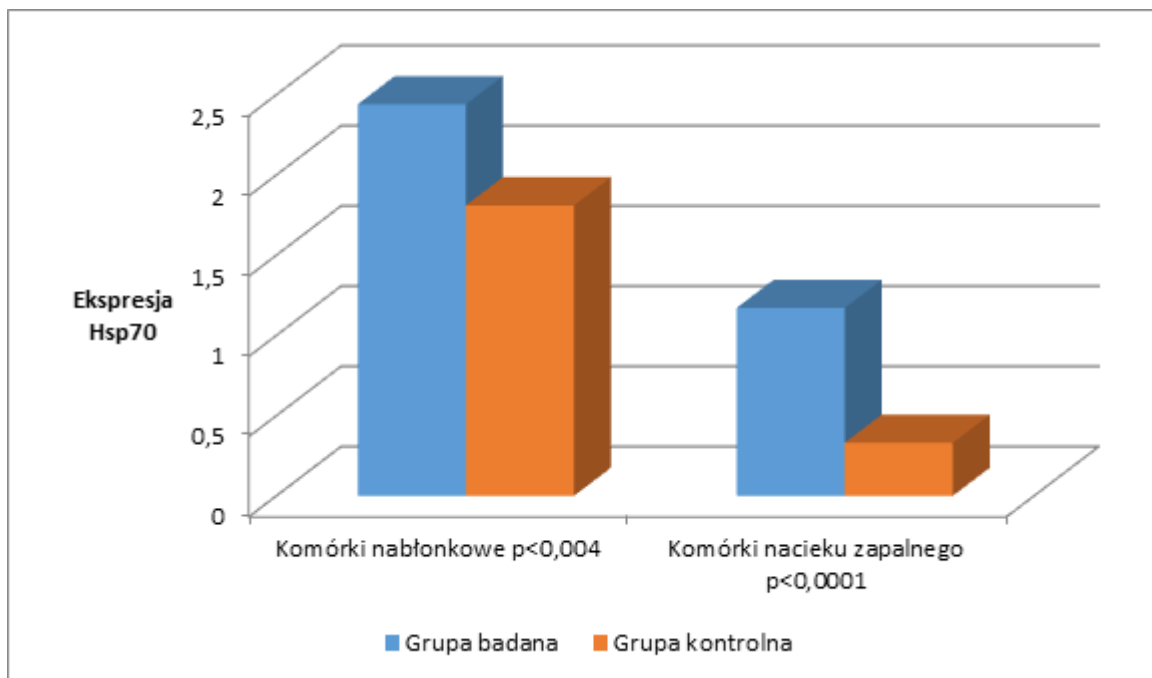
Tabela 7. Ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego w grupie kontrolnej

Grupa kontrolna	Średnia	n	SD	Q25	Mediana	Q75	Poziom istotności test Wilcoxona
Hsp70 nabł.	1,81	36	0,92	1,00	2,00	2,00	p <0,0001
Hsp70 nac.	0,33	36	0,48	0,00	0,00	1,00	
Hsc70 nabł.	1,36	36	1,05	0,00	1,50	2,00	p <0,001
Hsc70 nac.	0,86	36	0,72	0,00	1,00	1,00	

n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; Q25 – pierwszy kwartył; Q75 – trzeci kwartył; Hsp70 nabł. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; Hsp70 nac. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; Hsc70 nabł. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; Hsc70 nac. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego

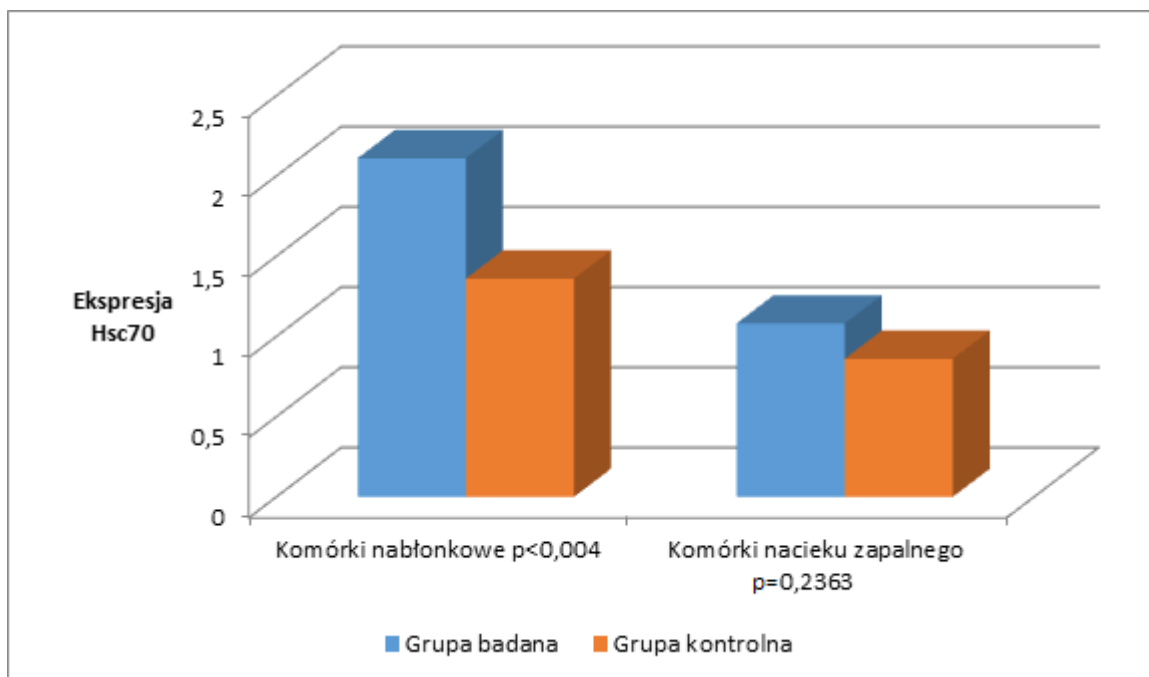
Ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego była istotnie wyższa u chorych na WZJG w porównaniu z grupą kontrolną ( $2,44 \pm 0,73$  vs  $1,81 \pm 0,82$ ;  $p < 0,004$ ). Podobnie w komórkach nacieku zapalnego stwierdzono istotnie wyższą ekspresję białka Hsp70 w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną ( $1,17 \pm 0,65$  vs  $0,33 \pm 0,48$ ;  $p < 0,0001$ ). Obrazuje to wykres 1.





**Wykres 1. Porównanie ekspresji białka Hsp70 (mediana) w grupie badanej i grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego**

Ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonka jelita grubego była również istotnie statystycznie wyższa u chorych w porównaniu z grupą kontrolną ( $2,11 \pm 0,92$  vs  $1,36 \pm 1,05$ ;  $p < 0,004$ ). Z kolei w komórkach nacieku zapalnego nie wykazano istotnej statystycznie różnicy ekspresji Hsc70 pomiędzy obiema grupami, choć także obserwowano wyższe wartości w grupie badanej niż w kontrolnej ( $1,08 \pm 0,73$  vs  $0,86 \pm 0,72$ ;  $p = 0,2363$ ). Uwidoczniono to na wykresie 2.



**Wykres 2. Porównanie ekspresji białka Hsc70 (mediana) w grupie badanej i grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego**

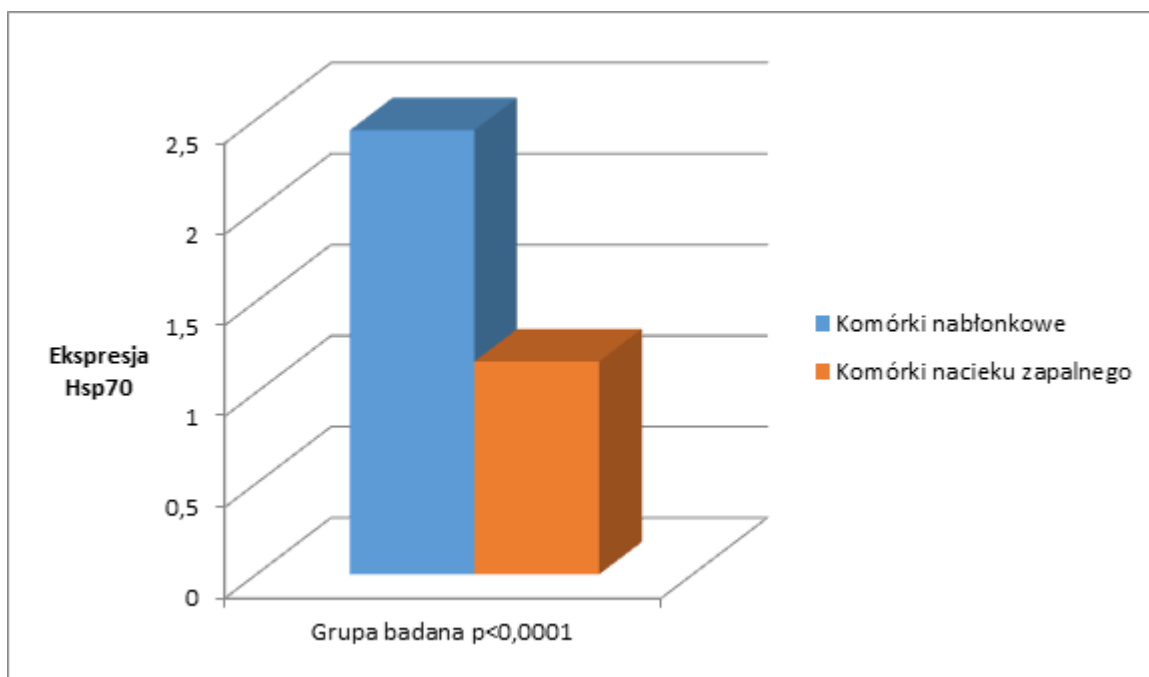
Wyniki analizy wzajemnych korelacji ekspresji badanych białek w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego przedstawiono w tabeli 8. Stwierdzono wysoką dodatnią korelację ekspresji białka Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego z ekspresją w komórkach nacieku zapalnego ( $r = 0,5646$ ;  $p < 0,05$ ). Wykazano także przeciętną dodatnią korelację ekspresji Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego z ekspresją białka Hsc70 w tych komórkach ( $r = 0,4384$ ;  $p < 0,05$ ), jak również z ekspresją Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego ( $r = 0,3861$ ;  $p < 0,05$ ). Ponadto stwierdzono wysoką korelację dodatnią ekspresji białka Hsc70 w komórkach nabłonka jelita grubego z jego ekspresją w komórkach nacieku zapalnego ( $r = 0,6382$ ;  $p < 0,05$ ). Pozostałe oceniane korelacje były słabe lub nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej.

**Tabela 8. Korelacje pomiędzy ekspresją białka Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonka i komórkach nacieku zapalnego w grupie badanej**

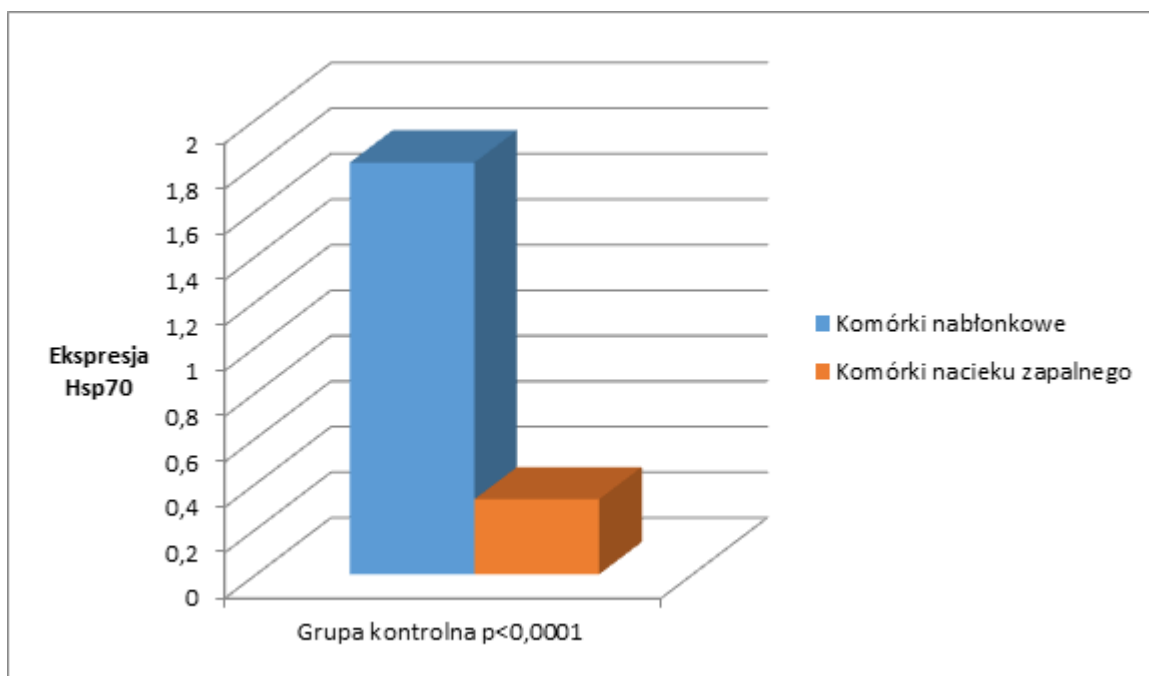
Grupa badana	Hsp70 nabł.	Hsp70 nac.	Hsc70 nabł.	Hsc70 nac.
Hsp70 nabł.	1,0000	<b>0,5646</b>	<b>0,4384</b>	<b>0,3861</b>
Hsp70 nac.	<b>0,5646</b>	1,0000	0,2779	0,3204
Hsc70 nabł.	<b>0,4384</b>	0,2779	1,0000	<b>0,6382</b>
Hsc70 nac.	<b>0,3861</b>	0,3204	<b>0,6382</b>	1,0000

**Hsp70 nabł.** – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; **Hsp70 nac.** – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; **Hsc70 nabł.** – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; **Hsc70 nac.** – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego. Pogrubioną czcionką zaznaczono korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

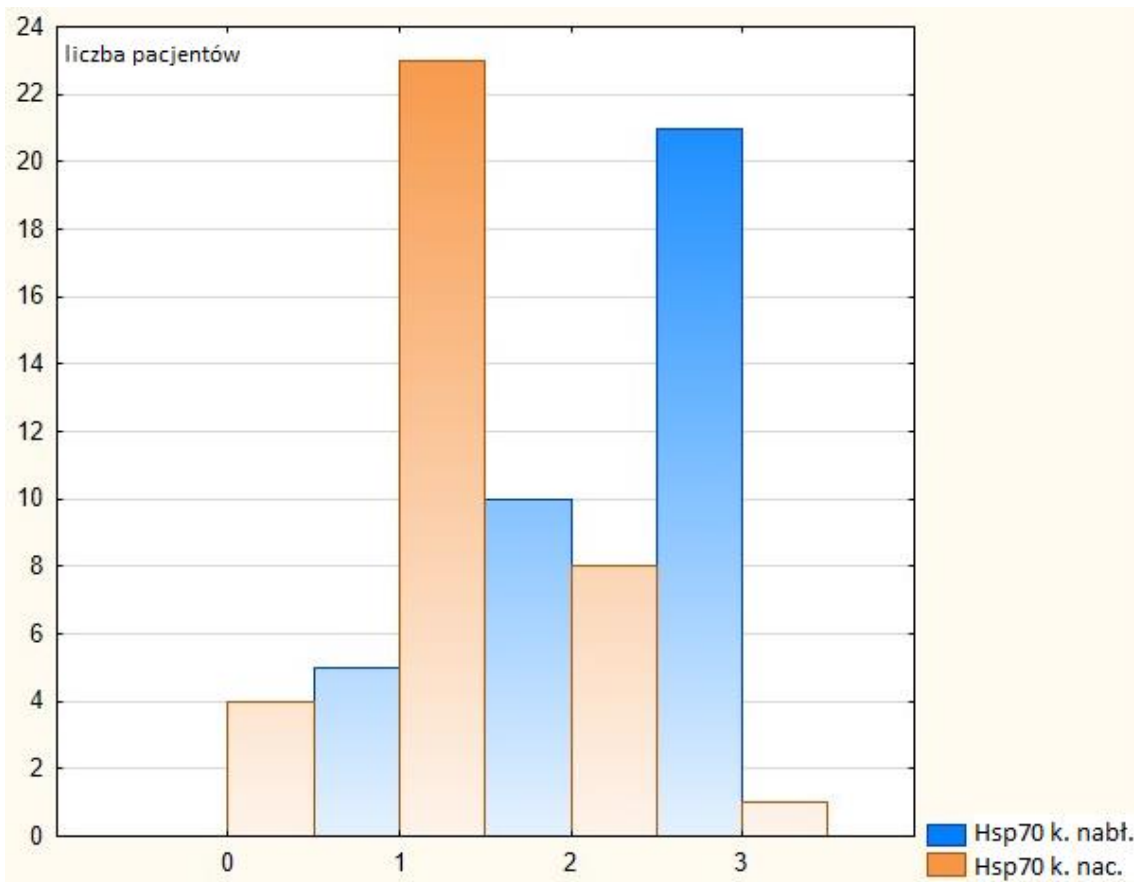
Obserwowana ekspresja białka Hsp70 jest istotnie statystycznie wyższa w komórkach nabłonka jelita grubego niż w komórkach nacieku zapalnego. Zależność tę potwierdzono zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej ( $2,44 \pm 0,73$  vs  $1,17 \pm 0,65$ ;  $p < 0,0001$  oraz  $1,81 \pm 0,72$  vs  $0,33 \pm 0,48$ ;  $p < 0,0001$ ) – wyniki przedstawiono na wykresach 3. i 4. Z kolei na wykresie 5. zaprezentowano liczbę pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego.



**Wykres 3. Porównanie ekspresji białka Hsp70 (mediana) w grupie badanej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego**

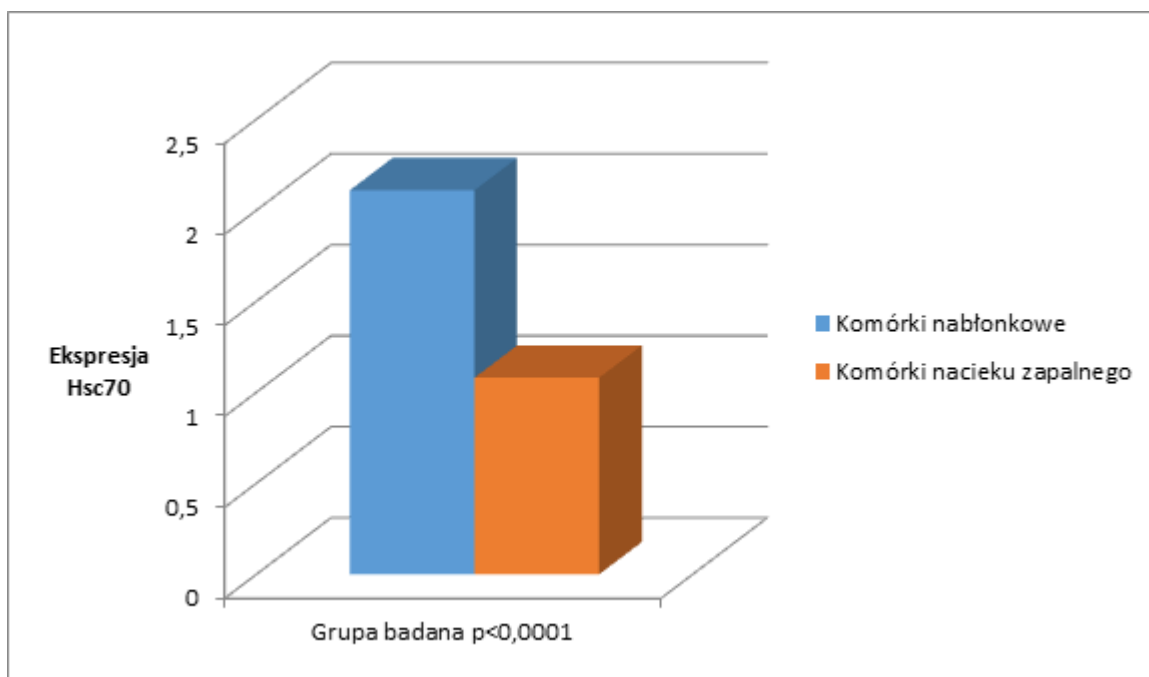


**Wykres 4. Porównanie ekspresji białka Hsp70 (mediana) w grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego**

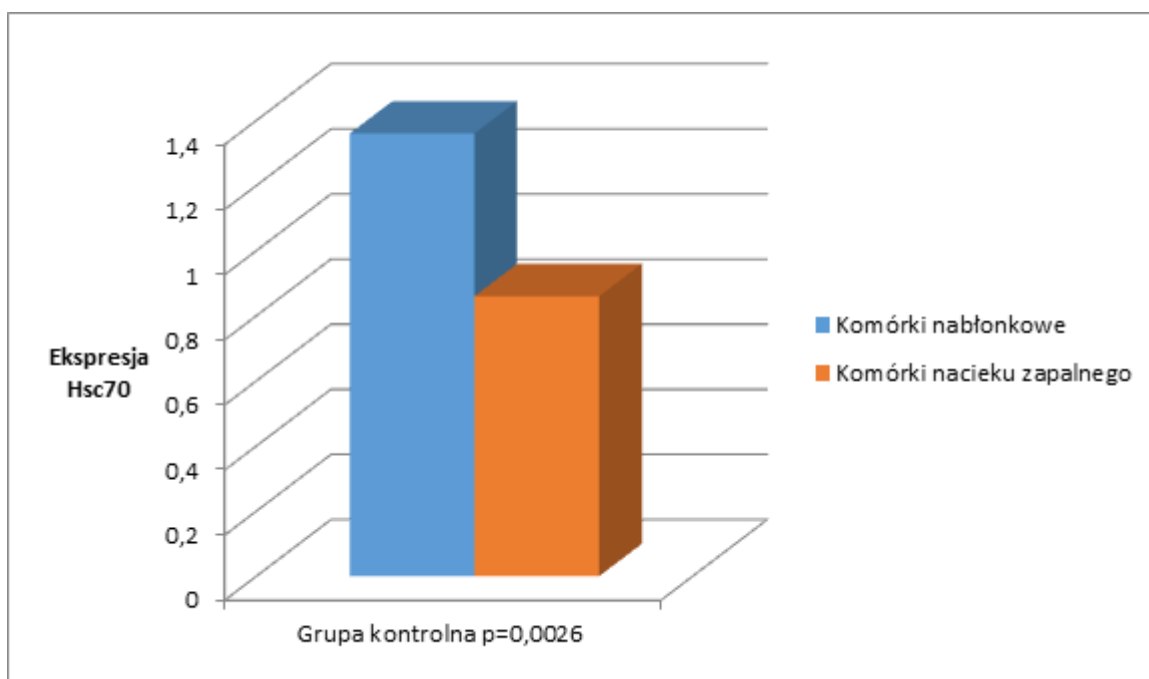


**Wykres 5. Liczba pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego**

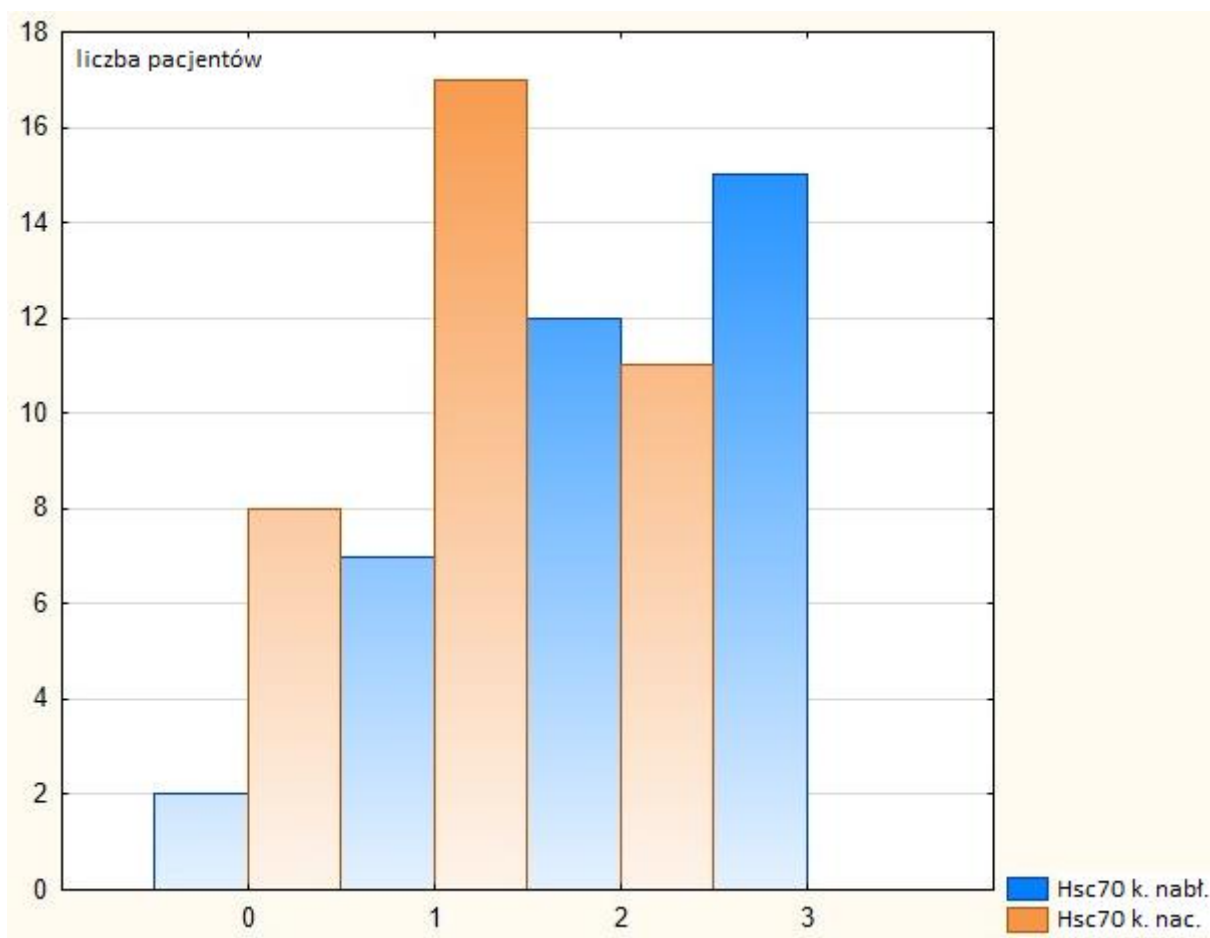
Ekspresja białka Hsc70 w obu grupach była także istotnie wyższa w komórkach nabłonkowych niż w komórkach nacieku zapalnego (w grupie badanej  $2,11 \pm 0,92$  vs  $1,08 \pm 0,73$ ;  $p < 0,0001$ , w grupie kontrolnej  $1,36 \pm 1,05$  vs  $0,86 \pm 0,72$ ;  $p = 0,0026$ ). Wyniki przedstawiono na wykresach 6. i 7., a na wykresie 8. zaprezentowano liczbę pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego.



**Wykres 6. Porównanie ekspresji białka Hsc70 (mediana) w grupie badanej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego**



**Wykres 7. Porównanie ekspresji białka Hsc70 (mediana) w grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego**



**Wykres 8. Liczba pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego**

#### **4.3. Ocena korelacji ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 z aktywnością i zasięgiem choroby w grupie badanej**

Wszystkich pacjentów z grupy badanej analizowano pod względem rozległości zmian zapalnych w obrębie jelita grubego oraz aktywności choroby w trakcie hospitalizacji i pobierania materiału biopsyjnego do badań. Wyniki tych analiz wyrażono odpowiednio w skali montrealskiej zasięgu choroby oraz skali montrealskiej aktywności choroby, a następnie

oceniono pod względem ewentualnych korelacji tych danych z poziomem ekspresji białek Hsp70 i Hsc70.

W grupie chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego nie obserwowano istotnej statystycznie korelacji zasięgu choroby ocenianego według skali montrealskiej z poziomem ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 badanym w komórkach nabłonka jelita grubego oraz komórkach nacieku zapalnego.

Nie wykazano również istotnych statystycznie korelacji aktywności choroby ocenianej według skali montrealskiej z poziomem ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 obserwowanym w komórkach nabłonka jelita grubego oraz komórkach nacieku zapalnego.

Pacjentów z grupy badanej podzielono dodatkowo na dwie podgrupy ze względu na aktywność choroby: osoby będące w czasie badań w okresie remisji WZJG (aktywność choroby według skali montrealskiej 0) oraz osoby z ostrym rzutem WZJG niezależnie od stopnia ciężkości tego rzutu (aktywność choroby według skali montrealskiej 1, 2 i 3).

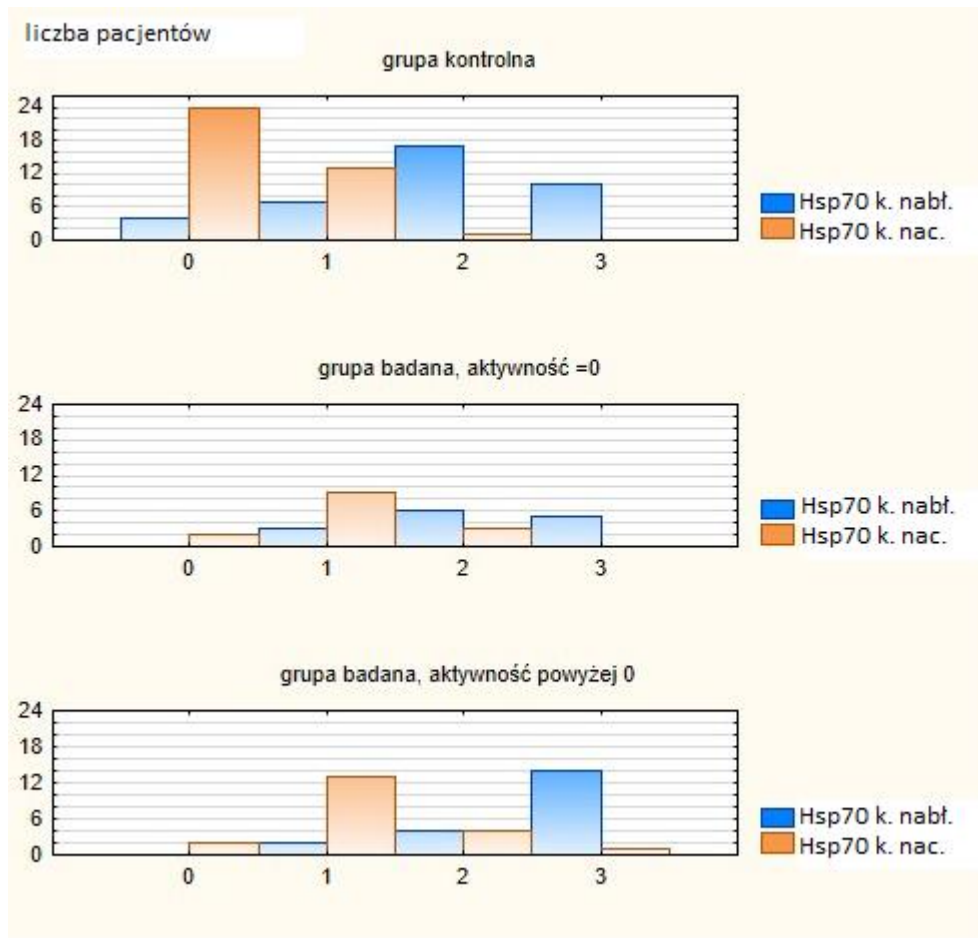
Ekspresja Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego była wyższa w podgrupie z ostrym rzutem choroby od ekspresji tego białka u pacjentów w okresie remisji, jednak różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ( $p = 0,062$ ). W komórkach nacieku zapalnego ekspresja Hsp70 w obu podgrupach nie różniła się statystycznie w istotnym stopniu ( $p = 0,6799$ ). W przypadku ekspresji białka Hsc70 w podgrupie z ostrym rzutem choroby w porównaniu z podgrupą w okresie remisji nie wykazano istotnych statystycznie różnic ani w komórkach nabłonka jelita grubego, ani w komórkach nacieku zapalnego (w komórkach nabłonkowych  $p = 0,1529$ ; w komórkach nacieku zapalnego  $p = 0,1925$ ). Wyniki przedstawiono w tabeli 9., natomiast liczbę pacjentów z poszczególną punktacją w ocenie ekspresji białek w skali półilościowej na wykresach 9. (białko Hsp70) oraz 10. (białko Hsc70).



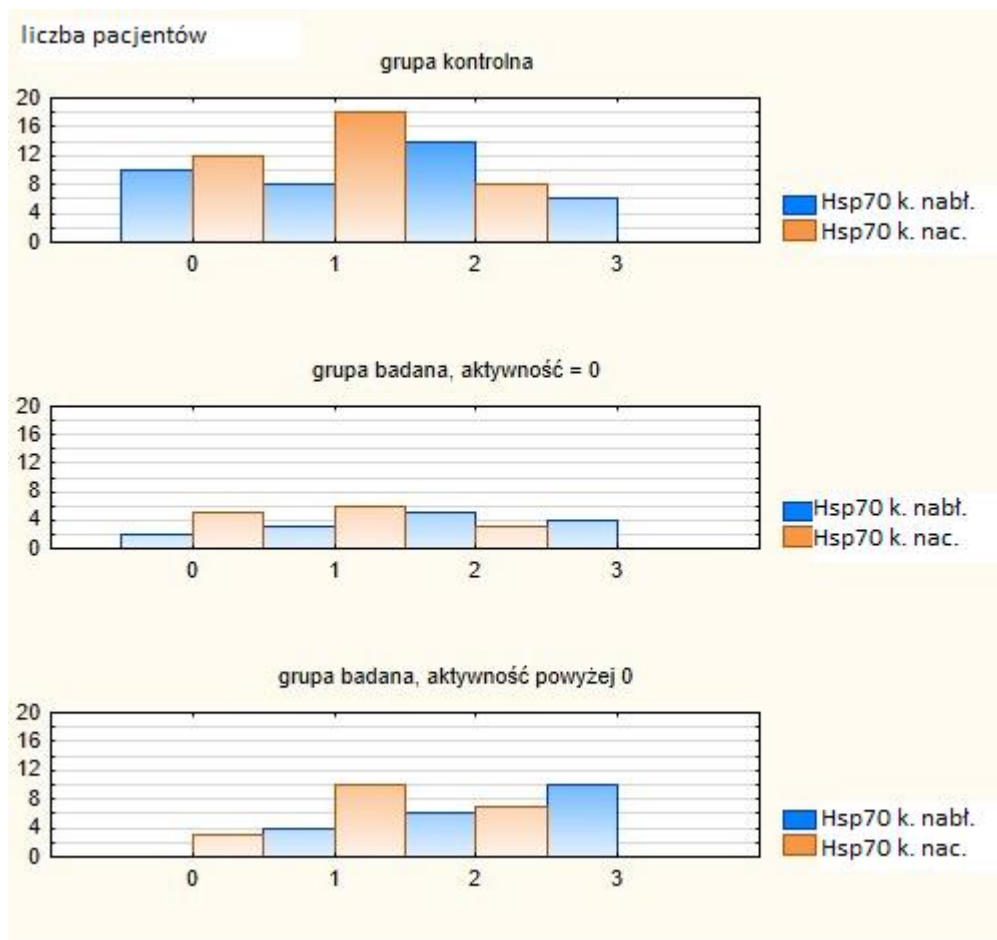
**Tabela 9. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych z aktywną chorobą z pacjentami w okresie remisji klinicznej**

Badane białko	Grupa pacjentów	Średnie	n	SD	Q25	Mediana	Q75	Poziom istotności p
Hsp70 nabł.	0	2,14	14	0,77	2	2	3	0,062
	1	2,60	20	0,68	2	3	3	
	Ogół	2,41	34	0,74	2	3	3	
Hsp70 nac.	0	1,07	14	0,62	1	1	1	0,6799
	1	1,2	20	0,70	1	1	1,5	
	Ogół	1,15	34	0,66	1	1	1	
Hsc70 nabł.	0	1,79	14	1,05	1	2	3	0,1529
	1	2,30	20	0,80	2	2,5	3	
	Ogół	2,09	34	0,93	1	2	3	
Hsc70 nac.	0	0,86	14	0,77	0	1	1	0,1925
	1	1,20	20	0,70	1	1	2	
	Ogół	1,06	34	0,74	1	1	2	

**0** – podgrupa chorych z aktywnością choroby według skali montrealskiej = 0; **1** – podgrupa chorych z aktywnością choroby według skali montrealskiej > 0 (1, 2 i 3); **n** – liczba pacjentów; **SD** – odchylenie standardowe; **Q25** – pierwszy kwartył; **Q75** – trzeci kwartył; **Hsp70 nabł.** – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; **Hsp70 nac.** – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; **Hsc70 nabł.** – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; **Hsc70 nac.** – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego



**Wykres 9. Rozkład pacjentów z grup badanej i kontrolnej z poszczególnym poziomem ekspresji Hsp70 w podgrupie w okresie remisji choroby (skala montrealaska aktywności = 0) oraz w podgrupie w okresie rzutu choroby (skala montrealaska aktywności > 0)**



**Wykres 10. Rozkład pacjentów z grup badanej i kontrolnej z poszczególnym poziomem ekspresji Hsc70 w podgrupie w okresie remisji choroby (skala montrealaska aktywności = 0) oraz w podgrupie w okresie rzutu choroby (skala montrealaska aktywności > 0).**

Podgrupy chorych w okresie ostrego rzutu choroby i w okresie remisji porównano także rozdzielnie z grupą kontrolną pod względem ekspresji białka Hsp70 i Hsc70.

Porównanie podgrupy chorych w okresie ostrego rzutu choroby z grupą kontrolną wykazało istotnie statystycznie wyższe poziomy ekspresji białka Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego ( $p = 0,0023$ ) oraz w komórkach nacieku zapalnego ( $p < 0,0001$ ) w pierwszej z nich. Poziom ekspresji Hsc70 także był w stopniu statystycznie istotnym wyższy w podgrupie chorych z ostrym rzutem choroby w zakresie komórek nabłonkowych ( $p = 0,0028$ ), w komórkach nacieku zapalnego w obu grupach zaś nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie ( $p = 0,1300$ ). Wyniki przedstawiono w tabeli 10.

**Tabela 10. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych z aktywną chorobą i w grupie kontrolnej**

Badane białko	Grupa pacjentów	Średnie	n	SD	Q25	Mediana	Q75	Poziom istotności p
Hsp70 nabł.	1	2,60	20	0,68	2	3	3	<b>0,0023</b>
	2	1,87	38	0,93	1	2	3	
	Ogół	2,12	58	0,92	2	2	3	
Hsp70 nac.	1	1,20	20	0,70	1	1	1,5	<b>&lt; 0,0001</b>
	2	0,39	38	0,55	0	0	1	
	Ogół	0,67	58	0,71	0	1	1	
Hsc70 nabł.	1	2,30	14	0,80	2	2,5	3	<b>0,0028</b>
	2	1,42	20	1,06	0	2	2	
	Ogół	1,72	58	1,06	1	2	3	
Hsc70 nac.	1	1,20	20	0,70	1	1	2	0,1300
	2	0,89	38	0,73	0	1	1	
	Ogół	1,00	58	0,73	0	1	2	

**0 – podgrupa chorych z aktywnością choroby według skali montrealskiej > 0 (1, 2 i 3); 1 – grupa kontrolna; n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; Q25 – pierwszy kwartył; Q75 – trzeci kwartył; Hsp70 nabł. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; Hsp70 nac. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; Hsc70 nabł. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; Hsc70 nac. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego. Pogrubioną czcionką zaznaczono korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).**

Ekspresja białka Hsp70 w podgrupie w okresie remisji choroby nie różniła się statystycznie istotnie od ekspresji w grupie kontrolnej w populacji komórek nabłonkowych, była natomiast istotnie statystycznie wyższa w populacji komórek nacieku zapalnego ( $p = 0,0009$ ). Ocena ekspresji Hsc70 nie wykazała istotnych statystycznie różnic między grupami w komórkach nabłonka jelita grubego i w komórkach nacieku zapalnego. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

**Tabela 11. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych w okresie remisji klinicznej i w grupie kontrolnej**

Badane białko	Grupa pacjentów	Średnie	n	SD	Q25	Mediana	Q75	Poziom istotności p
Hsp70 nabł.	0	2,14	14	0,77	2	2	3	0,4039
	1	1,87	38	0,93	1	2	3	
	Ogół	1,94	52	0,89	1	2	3	
Hsp70 nac.	0	1,07	14	0,62	1	1	1	<b>0,0009</b>
	1	0,39	38	0,55	0	0	1	
	Ogół	0,58	52	0,64	0	0,5	1	
Hsc70 nabł.	0	1,79	14	1,05	1	2	3	0,2781
	1	1,42	38	1,06	0	2	2	
	Ogół	1,52	52	1,06	1	2	2	
Hsc70 nac.	0	0,86	14	0,77	0	1	1	0,8673
	1	0,89	38	0,73	0	1	1	
	Ogół	0,88	52	0,73	0	1	1	

0 – podgrupa chorych z aktywnością choroby według skali montrealskiej = 0; 1 – grupa kontrolna; n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; Q25 – pierwszy kwartył; Q75 – trzeci kwartył; Hsp70 nabł. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; Hsp70 nac. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; Hsc70 nabł. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; Hsc70 nac. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego. Pogrubioną czcionką zaznaczono korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4. Ocena korelacji ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 ze stężeniem parametrów stanu zapalnego oraz obecnością przeciwciał swoistych dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

Znaczna część pacjentów z grupy badanej miała oznaczony panel autoprzeciwciał występujących w nieswoistych zapaleniach jelit. Grupę badaną oceniono zatem ze względu na występowanie ewentualnych korelacji obecności owych autoprzeciwciał z poziomem ekspresji białek Hsp70 i Hsc70.

Nie wykazano istotnej statystycznie korelacji obecności przeciwciał pANCA w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej z ekspresją białka Hsp70 ani w komórkach nabłonka jelita grubego ( $r = -0,017$ ;  $p > 0,05$ ), ani w komórkach nacieku zapalnego ( $r = -0,177$ ;  $p > 0,05$ ).

Stwierdzono natomiast istotną statystycznie, przeciętną korelację obecności przeciwciał pANCA w surowicy krwi z ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonka jelita grubego ( $r = 0,4416$ ;  $p < 0,05$ ). Takiej zależności nie zaobserwowano dla ekspresji białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego ( $r = 0,2519$ ;  $p > 0,05$ ).

Zauważono ponadto istotną statystycznie, przeciętną korelację obecności przeciwciał przeciwko komórkom kubkowym jelita (GAB) w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej z ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego ( $r = 0,419$ ;  $p < 0,05$ ). Nie stwierdzono takiej zależności dla ekspresji białka w komórkach nacieku zapalnego ( $r = 0,263$ ;  $p > 0,05$ ).

Ocena korelacji obecności przeciwciał GAB w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej z ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonka jelita grubego i komórkach nacieku zapalnego nie wykazała żadnych zależności istotnych statystycznie (odpowiednio  $r = 0,2235$ ;  $p > 0,05$  i  $r = -0,0946$ ;  $p > 0,05$ ). Wyniki analizy korelacji ekspresji badanych białek (Hsp70 i Hsc70) z występowaniem autoprzeciwciał (pANCA i GAB) przedstawiono w tabeli 12.

**Tabela 12. Korelacje występowania autoprzeciwciał z badanymi białkami w grupie badanej**

	<b>GAB</b>	<b>pANCA</b>
<b>Hsp70 nabł.</b>	<b>0,4190</b>	-0,0173
<b>Hsp70 nac.</b>	0,2633	-0,1770
<b>Hsc70 nabł.</b>	0,2235	<b>0,4416</b>
<b>Hsc70 nac.</b>	-0,0946	0,2519

**GAB – przeciwciała przeciw komórkom kubkowym jelita; pANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów; Hsp70 nabł. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; Hsp70 nac. – ekspresja białka Hsp70 w komórkach nacieku zapalnego; Hsc70 nabł. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; Hsc70 nac. – ekspresja białka Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego. Pogrubioną czcionką zaznaczono korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).**

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji stężenia analizowanych parametrów stanu zapalnego w surowicy krwi (odsetka leukocytów WBC, białka C-reaktywnego CRP oraz odczynu Biernackiego OB) z ekspresją białka Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego.

Wykazano wysoką korelację parametrów CRP i OB ( $r = 0,6098$ ;  $p < 0,05$ ). Stężenie CRP było istotnie wyższe w grupie chorych z ostrym rzutem choroby w porównaniu z chorymi w okresie remisji WZJG ( $p < 0,015$ ).

#### **4.5. Analiza występowania autoprzeciwciał pANCA i GAB**

Autoprzeciwciała pANCA wykryto u 56% pacjentów z grupy badanej, obecność przeciwciał GAB u 20% chorych.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności występowania przeciwciał pANCA z aktywnością i zasięgiem choroby ocenianymi w skali montrealskiej (odpowiednio  $r = 0,1878$ ;  $p > 0,05$  i  $r = 0,0500$ ;  $p > 0,05$ ).

W grupie badanej zaobserwowano istotną statystycznie, dodatnią, przeciętną korelację obecności przeciwciał GAB w surowicy krwi z aktywnością choroby ocenianą w skali montrealskiej ( $r = 0,4703$ ,  $p < 0,05$ ). Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji występowania tych przeciwciał z zasięgiem choroby ocenianym w skali montrealskiej ( $r = 0,2063$ ,  $p > 0,05$ ). Dane te przedstawiono w tabeli 13.

**Tabela 13. Korelacje występowania autoprzeciwciał z aktywnością i zasięgiem choroby ocenianymi w skali montrealskiej w grupie badanej**

	<b>GAB</b>	<b>pANCA</b>
<b>Skala montrealaska zasięgu</b>	0,2063	0,0500
<b>Skala montrealaska aktywności</b>	<b>0,4703</b>	0,1878

**GAB – przeciwciała przeciw komórkom kubkowym jelita; pANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów. Pogrubioną czcionką zaznaczono korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).**



## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Charakterystyka ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego

Podstawowym celem przeprowadzonego badania była ocena ekspresji białek Hsp70 oraz Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego u 72 pacjentów, a następnie jej porównanie w grupie chorych na WZJG z ekspresją u osób bez nieswoistych zapaleń jelit. Ekspresję obu białek obserwowano w dwóch warstwach błony śluzowej jelita grubego – w leżących powierzchniowo w stosunku do światła jelita komórkach nabłonkowych oraz w komórkach nacieku zapalnego położonych głębiej, w blaszce właściwej błony śluzowej. Zarówno u chorych na WZJG, jak i w grupie kontrolnej stwierdzono istotnie wyższą ekspresję obu badanych białek w komórkach nabłonka jelita niż w komórkach nacieku zapalnego. D. Ludwig i wsp. w swojej pracy również obserwowali wyraźnie wyższą ekspresję białek Hsp70 oraz Hsc70 w komórkach nabłonka jelita grubego w porównaniu z ocenianymi w badaniu komórkami jednojądrzastymi blaszki właściwej błony śluzowej. Taką zależność autorzy wykazali zarówno w grupie chorych na WZJG, jak i w grupie kontrolnej, co także pozostaje w zgodzie z wynikami prezentowanej pracy [113]. W badaniu Ludwiga i wsp. dodatkowo dokonano oceny ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w głębszych warstwach ściany jelita grubego – w komórkach śródbłonka błony śluzowej, komórkach jednojądrzastych, komórkach śródbłonka i nerwowych błony podśluzowej, a także w błonie mięśniowej i surowiczej. We wszystkich analizowanych rodzajach komórek autorzy stwierdzili niską ekspresję badanych białek. Ocena głębszych warstw ściany jelita grubego była możliwa dzięki badaniom przeprowadzonym na preparatach uzyskanych z materiału operacyjnego z zabiegów resekcji jelita grubego [113]. W niniejszej pracy dokonanie porównywalnej analizy było niemożliwe z uwagi na wykorzystanie w przeważającej mierze preparatów pochodzących z biopsji jelita grubego wykonanych podczas badań endoskopowych, a nie w trakcie zabiegów chirurgicznych. Głębokość pobrania wycinków endoskopowych nie powinna przekraczać błony śluzowej z uwagi na bezpieczeństwo chorego. Naruszenie

głębszych warstw ściany jelita niesie bowiem ze sobą ryzyko perforacji. Część analizowanych preparatów zawierała elementy warstwy mięśniowej ściany jelita i w jej komórkach wyraźnie widoczna była ekspresja badanych białek. Ilość takich preparatów była jednak zbyt mała, aby ewentualne wyniki oceniać i poddawać analizie statystycznej. Badanie ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w materiale biopsyjnym pobranym podczas endoskopii ma jednak w pewnych aspektach przewagę nad obserwacją preparatów pochodzących z resekowanego operacyjnie jelita. W ostatnim z tych przypadków kryteria włączenia do grupy chorych na WZJG muszą ograniczać się do pacjentów kwalifikujących się do leczenia operacyjnego, a więc najczęściej z długim wywiadem chorobowym i obecnością licznych zmian przewlekłych niepoddających się leczeniu farmakologicznemu. Dodatkowo resekcji jelita podlegają chorzy z burzliwym przebiegiem choroby, częstymi ostrymi jej rzutami niepoddającymi się leczeniu zachowawczemu lub ze stwierdzonym zjawiskiem steroidozależności. Zwłaszcza pierwsza grupa chorych, z długim wywiadem chorobowym i obecnością przewlekłych zmian zapalnych, niesie ze sobą podwyższone ryzyko obecności w resekowanym jelicie zmian nowotworowych lub przednowotworowych. Poważnym problemem w badaniach opartych na materiale operacyjnym pochodzącym z zabiegów resekcji jelita grubego jest także ustalenie kryteriów włączenia osób do grupy kontrolnej. Często, jak w przytaczanym badaniu Ludwiga i wsp., do obserwacji wykorzystuje się niezmienną tkankę jelita usuwanego z powodu procesu nowotworowego przebiegającego w innym jego odcinku. Wiadomo jednak, iż obecność takiego procesu w obrębie jelita grubego w istotnym stopniu podwyższa ekspresję białka Hsp70. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia, iż również dysplazja w obrębie błony śluzowej jelita grubego chorych na WZJG może być przyczyną wzrostu ekspresji Hsp70 [122, 123]. I odwrotnie: poziom ekspresji tego białka ma też wpływ na rozwój i przebieg raka jelita grubego, co czyni Hsp70 istotnym obiektem badań nad nowymi metodami terapeutycznymi w onkologii [123, 124, 125, 126]. Nie dowiedziono do tej pory, czy zmiany ekspresji białka Hsp70 związane z procesem nowotworowym są ograniczone wyłącznie do odcinka, w którym występuje proces rozrostowy, czy też dotyczą one całego jelita grubego. W świetle tych doniesień zasadne wydaje się wykluczenie chorych z wywiadem raka jelita grubego z takich badań, w których przedmiotem oceny ma być ekspresja Hsp70 w innych jednostkach chorobowych. Z tego powodu w prezentowanej pracy dodatni wywiad nowotworowy w obrębie jelita grubego znalazł się wśród kryteriów wykluczenia pacjentów z obu badanych grup. Jednocześnie analiza niedawnych publikacji na

temat związków ekspresji Hsp70 z rozwojem dysplazji, a następnie raka jelita grubego u chorych na WZJG, pozwala przypuszczać, iż jest to obiecujący kierunek dalszych badań na temat tego białka.

Ekspresja białek Hsp70 oraz Hsc70 w obrębie komórek nacieku zapalnego w blaszce właściwej błony śluzowej była istotnie niższa niż ich ekspresja w komórkach nabłonkowych. W grupie badanej wykazano jednak, iż ekspresja zarówno białka Hsp, jak i Hsc w komórkach nabłonka jelita grubego wysoce koreluje z ekspresją tych białek w komórkach nacieku zapalnego. Można więc przypuszczać, że ewentualna dynamika ekspresji Hsp oraz Hsc będzie się odzwierciedlać w obu badanych warstwach błony śluzowej.

## **5.2. Porównanie ekspresji białka Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z jego ekspresją w populacji niechorującej na nieswoiste zapalenia jelit**

Białko Hsp70 uważane było od dawna za niewykrywalne lub obecne w minimalnym stopniu w tkankach znajdujących się w warunkach homeostazy. Wielokrotnie udowodniono natomiast dynamiczny wzrost jego ekspresji w odpowiedzi na działanie niemal wszystkich czynników uszkadzających natury fizycznej, chemicznej czy biologicznej. Od lat bowiem białku Hsp70 przypisywane są tzw. funkcje opiekuńcze, a więc naprawa uszkodzonych komórek oraz usuwanie białek bezpowrotnie zniszczonych. Zauważono jednak, iż w niektórych tkankach, nawet w warunkach homeostazy, można stwierdzić niewielki, stały poziom ekspresji białka Hsp70. Kojima i wsp. stwierdzili u badanych myszy pewien podstawowy, obecny w warunkach bezstresowych poziom ekspresji białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych jelita grubego oraz końcowego odcinka jelita krętego (tzw. *ileum terminale*). W pozostałych częściach jelita cienkiego nie obserwowali żadnej ekspresji tego białka. Autorzy postawili, a następnie udowodnili tezę, iż to fizjologiczna flora bakteryjna jelita grubego oraz cytokiny produkowane przez limfocyty blaszki właściwej błony śluzowej jelita są powodem utrzymywania się wykrywalnej ekspresji białka Hsp70 w nabłonku jelita grubego [99]. W omawianych wynikach badania własnego ekspresja Hsp70 w komórkach nabłonkowych jelita i w mniejszym stopniu w komórkach nacieku zapalnego była

wykrywalna u pacjentów z grupy kontrolnej, a więc teoretycznie przy braku patologicznych czynników stresowych. Dane te zdają się potwierdzać pogląd o stałej ekspresji białka Hsp70 w ścianie jelita grubego *in vivo* u ludzi, choć takie badanie obarczone jest pewnym ryzykiem błędu. W badaniu własnym grupa kontrolna obejmuje pacjentów, u których wykluczono organiczne choroby jelita i ostatecznie postawiono diagnozę zaburzeń czynnościowych. Prawidłowe wyniki badań laboratoryjnych, endoskopowych oraz oceny histologicznej bioptatów jelita są potwierdzeniem właściwego doboru pacjentów do tej grupy, jednak należy brać pod uwagę fakt, iż byli to chorzy zgłaszający dolegliwości brzuszne. Z drugiej strony, bardziej rygorystyczne kryteria doboru grupy kontrolnej, pozwalające włączyć do niej jedynie osoby bez żadnych objawów klinicznych, byłyby nie do przyjęcia z punktu widzenia etycznego, biorąc pod uwagę inwazyjny charakter badań endoskopowych z biopsją.

Porównanie ekspresji białka Hsp70 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną wykazało istotnie wyższą ekspresję u chorych, zarówno w komórkach nabłonka jelita, jak i w komórkach nacieku zapalnego. Taki wynik był oczekiwany na podstawie wcześniejszych doniesień, jednak dotychczasowe badania przeprowadzono głównie w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórkowych lub na materiale pochodzącym od zwierząt laboratoryjnych. Stosunkowo niewiele prac dotyczących ekspresji białka Hsp70 w obrębie jelita grubego powstało na podstawie obserwacji tkanek ludzkich pobranych w trakcie praktyki klinicznej. Jedną z nich jest badanie Ludwiga i wsp., w którym u pacjentów z WZJG oraz chorobą Leśniowskiego-Crohna ekspresja Hsp70 była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej. Różnica ta występowała zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i w komórkach jednojądrzastych blaszki właściwej błony śluzowej. Wnioski wynikające z niniejszej rozprawy potwierdzają więc obserwacje poczynione podczas tamtego badania.

Do tej pory udowodniono kilka, częściowo ze sobą powiązanych, mechanizmów regulujących ekspresję białka Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego. Stanowią one wytłumaczenie zarówno jego obecności w zdrowej tkance, jak i dynamicznego wzrostu w czasie ostrego rzutu nieswoistych zapaleń jelit. Matsuo i wsp. dowiedli, że wyrzut endogennych sterydów spowodowany stresem emocjonalnym (w badaniu powodowany był 2-godzinnym skrępowaniem myszy laboratoryjnych) prowokuje wzrost ekspresji Hsp70 w komórkach nabłonkowych jelita grubego. W kolejnej części badania autorzy poprzedzili ekspozycję zwierząt na stres antybiotykoterapią, która w znacznym stopniu zredukowała

florę bakteryjną jelita grubego. Nie obserwowano wówczas wzrostu ekspresji Hsp70 w odpowiedzi na wyrzut hormonów sterydowych. Ponowną stymulację ekspresji białka osiągnięto po podaniu zwierzętom lipopolisacharydów (LPS), a więc składników błony śluzowej bakterii gram ujemnych, będących znanymi ligandami receptorów Toll-podobnych 4 (TLR-4) [127]. Eksperyment potwierdza istotny wpływ hormonów sterydowych oraz bakterii jelitowych na ekspresję Hsp70 w błonie śluzowej jelita. Fizjologiczna flora bakteryjna, jak już wcześniej wspomniano, jest uważana za jeden z podstawowych bodźców odpowiedzialnych za podstawową ekspresję Hsp w błonie śluzowej jelita grubego w stanie homeostazy [99]. Dzieje się tak dzięki sygnałom przekazywanym do układu immunologicznego ściany jelita za pośrednictwem receptorów Toll-podobnych (TLR) [128]. Należy jednak przypuszczać, że mechanizmy te odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji Hsp także w warunkach patologii, takich jak nieswoiste zapalenia jelit. Od dawna bowiem znane są istotne zaburzenia flory bakteryjnej jelita w przebiegu tych chorób, a kierunki poszukiwania nowych metod terapeutycznych obejmują także probiotyki [129, 130]. Kolejnym po glikokortykosteroidach i bakteriach jelitowych elementem pośredniczącym we wzroście poziomu ekspresji Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego dotkniętej stanem zapalnym są niektóre cytokiny. Takie właściwości stwierdzono na przykład w odniesieniu do interleukiny 2 (IL-2) [99]. Istotny wpływ na ekspresję białka Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego wykazują również niektóre leki, w tym preparaty stosowane w leczeniu WZJG. W grupie badanej do niniejszej pracy wszyscy chorzy otrzymywali leczenie zgodne z europejskimi wytycznymi [62]. Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) są najszerszej stosowaną grupą leków we WZJG. W wysokich dawkach mają udowodnioną skuteczność terapeutyczną w okresie ostrego rzutu choroby. W okresie bezobjawowym z kolei zalecane jest stosowanie dawki profilaktycznej w celu podtrzymania remisji oraz chemoprewencji raka jelita grubego [60, 62, 131]. W niniejszym badaniu wszyscy chorzy, z wyjątkiem jednego pacjenta z udokumentowanym wywiadem alergicznym, otrzymywali preparaty 5-ASA (najczęściej mesalazynę, rzadziej sulfasalazynę) doustnie lub doodbytniczo (forma podania leku zależała od zasięgu choroby). Burrell i wsp. wykazali, iż mesalazyna potęguje wzrost ekspresji białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych jelita w odpowiedzi na stres termiczny. W komórkach nieobjętych bodźcami drażniącymi nie wywiera jednak żadnego wpływu na ekspresję Hsp [120]. Sterydy podawane systemowo (doustnie lub dożylnie) są grupą leków najczęściej stosowaną w ostrym rzucie WZJG. Podobnie jak w przypadku endogennych

glikokortykosteroidów wydzielanych w sytuacjach stresowych, egzogenne podanie tych substancji powoduje znamieny wzrost ekspresji białka Hsp70 [125]. W prezentowanej pracy część chorych z grupy badanej otrzymywała również metronidazol. Ten chemioterapeutyk nie ma aktualnie precyzyjnie ustalonej pozycji w schemacie leczenia, istnieje jednak szereg badań sugerujących jego możliwą skuteczność w leczeniu ostrego rzutu choroby [132, 133]. Obecnie jest on zalecany głównie w leczeniu ostrego rzutu WZJG przy podejrzeniu współistnienia zakażenia bakteryjnego, szczególnie o etiologii *Clostridium difficile* [62]. Innym wskazaniem do terapii tym lekiem jest często współistniejący z nieswoistymi zapaleniami jelit zespół przerostu flory bakteryjnej jelita (SIBO) [130] i to on był najczęstszym powodem włączenia chemioterapeutyku w grupie badanej do prezentowanej tu pracy. W badaniu Arvansa i wsp. wykazano, że metronidazol w istotny sposób obniża ekspresję białek Hsp70 w błonie śluzowej jelita grubego [100]. Wydaje się, iż obecny zasób informacji na temat wpływu farmakoterapii WZJG na ekspresję białka Hsp70 wymaga jeszcze poszerzenia. Być może poznane już działanie w tym zakresie wyżej wymienionych preparatów zostanie w przyszłości uwzględnione w zaleceniach terapeutycznych WZJG. W przypadku wielu innych, jak choćby coraz częściej stosowanych leków biologicznych, ich wpływ na ekspresję białka Hsp70 nie został jeszcze poznany.

### **5.3. Związek ekspresji białka Hsp70 z aktywnością wrzodziejącego zapalenia jelita grubego**

Drugim zasadniczym celem, jaki postawiono sobie w prezentowanej pracy, było zbadanie ewentualnych zależności ekspresji białek Hsp70 z przebiegiem WZJG. Przyjęto hipotezę, że może być ona wyższa u chorych z zajęciem rozleglejszych odcinków jelita grubego, bądź ze zmianami wykazującymi większą aktywność procesu zapalnego. Nie stwierdzono jednak żadnych korelacji z zasięgiem choroby, ocenianym w skali montrealskiej – niezależnie od tego, czy chorzy mieli zdefiniowane zapalenie odbytnicy, lewostronną postać choroby czy pancolitis, ekspresja białka Hsp70 nie różniła się w sposób istotny. Taki rezultat można wytłumaczyć z jednej strony sposobem pozyskiwania preparatów do badania. W pracy wykorzystano retrospektywnie materiał biopsyjny, który pierwotnie służył

praktyce klinicznej. Wycinki były więc zawsze pobierane z miejsc z aktywnymi zmianami zapalnymi lub, w przypadku chorych w okresie remisji endoskopowej choroby, udokumentowanych wcześniej jako objętych procesem chorobowym. Z drugiej strony, we wcześniejszych publikacjach pojawiają się m.in. doniesienia o podwyższonej ekspresji Hsp70 w makroskopowo niezmienionej błonie śluzowej jelita grubego u chorych na nieswoiste zapalenie jelit [113]. Być może więc WZJG, nawet o ograniczonym zasięgu, jak w postaci lewostronnej lub zapaleniu odbytnicy, powoduje wzrost ekspresji białka Hsp70 w błonie śluzowej całego jelita grubego.

W pierwszej części prezentowanego badania wykazano istotną różnicę ekspresji białka Hsp70 pomiędzy chorymi a grupą kontrolną. Biorąc ten fakt pod uwagę, a także kierując się właściwościami tych białek do dynamicznego wzrostu ekspresji w odpowiedzi na bodźce stresowe, w dalszej części badania poszukiwano ewentualnych korelacji ekspresji białka Hsp70 ze stopniem nasilenia procesu zapalnego. Wszystkich chorych z grupy badanej oceniono pod względem aktywności choroby według skali montrealskiej. Nie wykazano jednak istotnej korelacji punktacji w tej skali z ekspresją Hsp70. Być może to zagadnienie wymagałoby jeszcze oceny na większej grupie badanej. Z drugiej strony, w aktualnym badaniu zwrócono uwagę, że odwrotnie niżby wynikało z właściwości białka Hsp70, jego ekspresja w komórkach nacieku zapalnego była niższa w podgrupie chorych z najwyższym stopniem aktywności zapalenia (3) niż w podgrupach z aktywnością średnią (2) i niską (1), a tendencja ta była bliska poziomowi istotności statystycznej, choć go nie osiągnęła ( $p = 0,0868$ ). Podobne obserwacje pojawiały się już w niektórych wcześniejszych publikacjach. Hu i wsp. w swoim badaniu opisali zjawisko paradoksalnego spadku ekspresji białka Hsp70 w błonie śluzowej objętej aktywnym zapaleniem. Bodźcem bezpośrednio powodującym regulację w dół (down-regulation) ekspresji Hsp są cytokiny prozapalne – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [134]. Podobne wnioski na podstawie własnego badania wyciągnęli Vlachos i wsp. Badacze zinterpretowali spadek ekspresji białka Hsp70 w nabłonku objętym najcięższym zapaleniem jako rezultat wyczerpania tego mechanizmu obronnego przez przewlekły proces zapalny [135].

Cytowane powyżej doniesienia, jak również część wyników prezentowanej pracy doktorskiej sugerują, iż mechanizmy regulujące ekspresję Hsp70 są zagadnieniem złożonym, a wzrost tej ekspresji w zależności od stopnia aktywności procesu zapalnego nie następuje

liniowo. Z drugiej strony, sam fakt wzrostu ekspresji Hsp70 w błonie śluzowej jelita w wyniku obecności aktywnego procesu zapalnego był często obserwowany w poprzednich badaniach [112, 113]. Analizując uzyskane wyniki, podjęto próbę wykazania, czy sam fakt zaostrzenia WZJG wiąże się z wyższą ekspresją Hsp70 w ścianie jelita w stosunku do chorych w okresie remisji. Dodatkowo porównano ekspresję badanego białka między chorymi bez aktywnego zapalenia i grupą kontrolną, aby ocenić, czy uzyskanie remisji choroby wiąże się z całkowitą normalizacją ekspresji Hsp70. Grupę badaną podzielono na dwie podgrupy – chorych z rzutem choroby niezależnie od jego stopnia ciężkości (aktywność w skali montrealskiej 1, 2 i 3) oraz chorych w okresie remisji (aktywność w skali montrealskiej 0). Ekspresja Hsp70 była wyższa u chorych z ostrym rzutem choroby niż u pacjentów w remisji, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż w komórkach nabłonkowych jelita grubego różnica ta była wyraźna i znalazła się blisko poziomu istotności statystycznej ( $p = 0,062$ ). U chorych w okresie remisji choroby wykazano wyższe wartości ekspresji białka Hsp70 w porównaniu z grupą kontrolną. Różnica była jednak istotna statystycznie jedynie w komórkach nacieku zapalnego. Porównanie ekspresji Hsp70 między chorymi z ostrym rzutem choroby a grupą kontrolną wykazało istotne statystycznie, wyraźnie wyższe wartości w nabłonku i nacieku zapalnym.

Podsumowując tę część badania, można więc wnioskować, że istnieje pewna gradacja stopnia ekspresji Hsp70 zależnie od tego, czy analizowana błona śluzowa jelita grubego jest całkowicie zdrowa, znajduje się w okresie remisji WZJG, czy też toczy się w niej aktywny proces chorobowy. Wykazane różnice nie są jednak dostatecznie wyraźne, aby można je poddać zdecydowanej interpretacji – nie wykazano istotnej różnicy w ekspresji Hsp70 pomiędzy podgrupami z ostrym rzutem i remisją choroby, jedynie różnica w komórkach nabłonka była bliska istotności statystycznej. Różnica pomiędzy chorymi w remisji choroby a grupą kontrolną była istotna tylko w komórkach nacieku zapalnego. Ponadto, w szczegółowej analizie podgrup chorych podzielonych według aktywności choroby, zwraca uwagę tendencja do spadku ekspresji białka Hsp70 u badanych z najcięższym rzutem WZJG.

Tomasello i wsp. w swoim badaniu porównali populację chorych z nowo rozpoznany WZJG w momencie diagnozy ustalonej w okresie ostrego rzutu choroby z tymi samymi chorymi w okresie remisji uzyskanej po półrocznej terapii mesalazyną i



probiotykiem. Dodatkowo do porównania autorzy dołączyli grupę kontrolną złożoną z pacjentów z niesklasyfikowanym zapaleniem jelit. W swojej pracy badacze wykazali istotny spadek ekspresji Hsp70 w komórkach nabłonka jelita grubego u chorych z wyjściowo wysokiego poziomu, do ekspresji nieróżniącej się istotnie od grupy kontrolnej. Podobnych zależności nie obserwowali w komórkach blaszki właściwej błony śluzowej. W aspekcie poziomu ekspresji białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych w zależności od aktywności choroby badanie Tomasello i wsp. jest zgodne z prezentowaną rozprawą doktorską. Brak jakichkolwiek różnic ekspresji białka w komórkach blaszki właściwej błony śluzowej jelita grubego w przytaczanej pracy jest jednak całkowicie sprzeczny z prezentowaną pracą doktorską i wykazanymi w niej istotnymi różnicami ekspresji Hsp70 pomiędzy chorymi z rzutem choroby a osobami zdrowymi oraz między chorymi w okresie remisji choroby i grupą kontrolną. Prezentowane wyniki badania własnego pozostają w sprzeczności z wnioskami Tomasello i wsp., iż nie ma istotnych różnic w zakresie ekspresji Hsp70 pomiędzy chorymi w okresie remisji a osobami zdrowymi. W przytaczanej pracy zwraca uwagę fakt, iż w grupie chorych poddanych badaniu znaleźli się pacjenci z rzutem choroby w stopniu lekkim lub średnim, a otrzymywane przez nich leczenie było bardzo jednolite i opierało się jedynie na pochodnych 5-ASA oraz probiotykach. Do badania nie włączano więc pacjentów z najwyższą aktywnością choroby. Nadto, nie do końca jasny jest wywiad osób stanowiących grupę kontrolną – autorzy określili ich rozpoznanie jako niespecyficzne zapalenie jelita grubego, a to pojęcie może obejmować zarówno chorych z niesklasyfikowanym nieswoistym zapaleniem jelit, jak i pacjentów z aktywnym zapaleniem o etiologii infekcyjnej [112]. Zagadnienie wydaje się więc warte pogłębienia w dalszych badaniach, zwłaszcza że już na obecnym etapie widać pewne różnice z danymi z innych publikacji, które warto byłoby poddać dalszej dyskusji.

#### **5.4. Porównanie ekspresji białka Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego z populacją niechorującą na nieswoiste zapalenia jelit**

Białko Hsc70, nazywane także Hsc73 lub HSPA8, różni się znacząco od Hsp70, mimo że oba należą do jednej rodziny i wykazują znaczną, bo 85% homologię budowy. Ekspresja Hsc70, w przeciwieństwie do Hsp70, jest wykrywalna we wszystkich komórkach organizmu na podobnym poziomie [82]. Kojima i wsp. w swojej pracy wykazali jednolitą ekspresję Hsc70 w błonie śluzowej jelita cienkiego i grubego u myszy, podczas gdy ekspresja Hsp70 była wykrywalna jedynie w jelicie grubym i końcowym odcinku jelita krętego. Poddali także komórki nabłonkowe jelita grubego stymulacji prozapalnymi cytokinami (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), leczeniu antybiotykami oraz ekspozycji na wyselekcjonowane szczepy bakterii jelitowych. Część z tych czynników istotnie podwyższała ekspresję białka Hsp70, jednocześnie nie obserwowano natomiast jakichkolwiek zmian ekspresji Hsc70 [99]. Z przytoczonych badań wynikałoby, że w prezentowanej pracy doktorskiej należało się spodziewać porównywalnej ekspresji białka Hsc70 w grupie badanej i grupie kontrolnej oraz braku istotnych różnic tej ekspresji w zależności od przebiegu WZJG. Takie wyniki uzyskano w przypadku oceny ekspresji Hsc70 w komórkach nacieku zapalnego – nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. U chorych ekspresja również nie różniła się istotnie w zależności od aktywności i zasięgu choroby. Wyniki były porównywalne w podgrupach chorych z ostrym rzutem choroby, w okresie remisji oraz w grupie kontrolnej. Ocena ekspresji Hsc70 w komórkach nabłonkowych wykazała jednak znacznie większe zróżnicowanie. Wykazano, że była ona istotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano istotnych korelacji ekspresji Hsc70 z aktywnością lub zasięgiem choroby ocenianymi według skali montrealskiej. Stwierdzono natomiast istotną różnicę pomiędzy podgrupą z ostrym rzutem choroby a grupą kontrolną. Różnica pomiędzy podgrupami z ostrym rzutem i remisją choroby nie była istotna statystycznie. Podobnie nie wykazano różnicy pomiędzy chorymi w okresie remisji a grupą kontrolną.

We wspomnianej już wcześniej pracy Kojima i wsp. dowiedli braku zmian ekspresji białka Hsc70 pod wpływem stymulacji cytokinami prozapalnymi czy szczepami bakterii

jelitowych. Badanie przeprowadzono na zwierzętach laboratoryjnych oraz równolegle w warunkach *in vitro* na hodowanych komórkach błony śluzowej jelita [99]. Z drugiej strony, Ludwig i wsp., w swoim badaniu przeprowadzonym na materiale ludzkim, stwierdzili istotnie wyższą ekspresję białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych jelita grubego u chorych na nieswoiste zapalenia jelit w porównaniu z osobami zdrowymi [113]. Wyniki badania Ludwiga i wsp. pokrywają się więc z obserwacjami z niniejszej rozprawy. Można wyciągnąć wnioski, iż prace, w których porównuje się chorych z grupą kontrolną, wykazują wyższą ekspresję białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych. Z tak skonstruowanych badań nie wynika jednak, w jakim czasie i pod wpływem jakich czynników dochodzi do wzrostu ekspresji tego białka u chorych. Być może poziom ekspresji Hsc70 jest wyższy u osób chorujących na WZJG od momentu rozpoznania choroby, a nawet wcześniej – przed wystąpieniem pierwszych jej objawów i zmian zapalnych w błonie śluzowej jelita. Niewykluczone też, że ekspresja ta pozostaje niezmienna przez cały okres choroby i nie ulega zmianom zależnie od stanu klinicznego, o czym może świadczyć brak istotnej różnicy między ekspresją Hsc70 u chorych z ostrym rzutem choroby i w okresie remisji. Takie przypuszczenia byłyby zgodne z przytaczanymi wcześniej wnioskami z badania Kojima i wsp. o braku wpływu aktywności limfocytów czy zmian flory bakteryjnej typowych dla toczącego się procesu zapalnego na poziom ekspresji Hsc70. Można by w ten sposób wytłumaczyć z jednej strony konstytutywne właściwości białka Hsc70, z drugiej zaś różnice pomiędzy chorującymi na WZJG a osobami zdrowymi. Takich dowodów mogłoby dostarczyć badanie, w którym oceniano by ekspresję Hsc70 w nabłonku jelita grubego u tych samych chorych w różnym czasie – na przykład w momencie rozpoznania choroby, w czasie zaostrzenia i w okresie remisji.

W prezentowanej rozprawie analiza wzajemnych korelacji badanych białek wykazała nadto istotną statystycznie korelację ekspresji białka Hsp70 z ekspresją Hsc70 w komórkach nabłonka. Siła zaobserwowanej korelacji jest przeciętna ( $r = 0,4384$ ), jednak sam fakt jej stwierdzenia jest zaskakujący. Dotychczas uważano bowiem, że ekspresja tych dwóch białek jest od siebie całkowicie niezależna. Co więcej, wielokrotnie potwierdzono fakt znacznej zmienności ekspresji białka Hsp70 zależnie od czynników stresowych, w przeciwieństwie do konstytutywnej ekspresji Hsc70. W dostępnym dotychczas piśmiennictwie brak jednak prac, w których oceniano by korelację ekspresji białek Hsp70 i Hsc70. Z tego powodu temat wydaje się interesujący jako przedmiot dalszych badań, na większej grupie pacjentów.

W chorobach reumatycznych, w których również obserwuje się zmiany ekspresji białka Hsp70, podobnie jak w nieswoistych zapaleniach jelit, przeważa pogląd o nieziennej ekspresji białka Hsc70. Z drugiej strony, pojawiają się prace polemizujące z tą teorią [136]. Białko Hsc70 jest znane od dawna, jednak doniesienia – szczególnie z ostatnich lat – sugerują, iż wiedza na jego temat nie jest jeszcze kompletna. Co więcej, istnieją sugestie, że dokładne poznanie właściwości białka Hsc70 i sposobów farmakologicznej regulacji jego ekspresji mogą otworzyć nowe możliwości terapeutyczne w wielu chorobach o podłożu zapalnym [82].

#### **5.5. Związek ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 z występowaniem autoprzeciwciał pANCA i GAB u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego**

Ostatnim z głównych celów przedstawianej pracy doktorskiej była ocena ewentualnych korelacji ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 z występowaniem autoprzeciwciał charakterystycznych dla WZJG oraz z wynikami wskaźników stanu zapalnego. Większość chorych w grupie badanej miała oznaczony profil przeciwciał jelitowych wykrywający ewentualną obecność autoprzeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów (pANCA) oraz przeciw komórkom kubkowym jelita (GAB). Przeciwciała pANCA stwierdzono u 56% chorych, przeciwciała GAB u 20%. Dane te są porównywalne z dotychczas przyjętą czułością oznaczeń tych przeciwciał oraz podobnymi badaniami chorych na WZJG [40, 39].

Rola autoprzeciwciał pANCA w patofizjologii WZJG jest od dawna przedmiotem zainteresowania wielu badań. Choć pierwsze doniesienie o związku choroby z pANCA pochodzi z 1966 roku [137], wiedzę o nich znacznie poszerzono w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Wśród badań z ostatnich lat pojawiają się także nowe prace wnoszące dodatkowe informacje na temat roli pANCA w nieswoistych zapaleniach jelit. W badaniu Targana i wsp. potwierdzono, iż miejscem produkcji przeciwciał pANCA w przebiegu WZJG są limfocyty B blaszki właściwej błony śluzowej jelita grubego. W konkluzjach autorzy stwierdzili, że produkcja przeciwciał w tej lokalizacji jest wyrazem śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej specyficznej dla choroby [138]. Przeciwciała wykrywane w nieswoistych

zapaleniach jelit różnią się od przeciwciał pANCA spotykanych u chorych na zapalenia naczyń i nazywane są atypowymi pANCA. Zasadnicza różnica polega na innym antygenie docelowym – w zapaleniach naczyń jest to zawsze mieloperoksydaza granulocytów obojętnochłonnych [139]. Dla atypowych przeciwciał pANCA zidentyfikowano natomiast wiele różnych antygenów docelowych – między innymi takie, jak laktoferyna, elastaza, lizozym, kapepsyna G, białka histonowe H1,  $\beta$ -glukoronidaza [139, 140]. Większość z tych antygenów nie jest specyficzna dla cytoplazmy neutrofilów ludzkich, ale można je wykryć u wielu organizmów eukariotycznych, w tym także u bakterii. Ewentualna reakcja krzyżowa wytworzenia pANCA przeciw antygenom niektórych bakterii jelitowych mogłaby stanowić element łączący patogenezę WZJG z zaburzeniami flory bakteryjnej okrężnicy. Istnieje więc teoria, że faktyczny antygen docelowy przeciwciał pANCA spotykanych u chorych na WZJG nie został jeszcze zidentyfikowany [139]. W niedawno opublikowanym badaniu, przeprowadzonym na grupie ponad sześciuset chorych, Waterman i wsp. potwierdzają, że wykrycie przeciwciał pANCA nie implikuje cięższego przebiegu klinicznego WZJG [141]. W prezentowanej rozprawie doktorskiej również poszukiwano ewentualnego związku obecności przeciwciał pANCA z przebiegiem klinicznym choroby, wyrażonym jej aktywnością i zasięgiem ocenianymi według skali montrealskiej. Nie wykazano jednak żadnej istotnej statystycznie korelacji tych parametrów z pANCA, co pozostaje w zgodzie z wnioskami sformułowanymi w pracy Watermana i wsp. Wcześniejsze badania wskazują jednak na pewien związek obecności pANCA z niektórymi cechami procesu chorobowego. W badaniu Sandborna i wsp. stwierdzono na przykład znacznie częstsze występowanie pANCA u chorych na postać lewostronną WZJG oporną na leczenie [142]. W innej publikacji Sandborn i wsp. wykazali również związek pANCA z występowaniem przewlekłego zapalenia zbiornika (tak zwane pouchitis) u chorych po resekcji jelita grubego z powodu WZJG [143]. Wykrycie przeciwciał pANCA u osoby bezobjawowej może wyprzedzać nawet wiele lat rozpoznanie WZJG, jest więc czynnikiem prognostycznym wystąpienia choroby [144]. Wobec tak wielu prób ustalenia roli autoprzeciwciał pANCA w patogenezie i przebiegu WZJG, w przedstawianej pracy doktorskiej podjęto próbę znalezienia ewentualnych korelacji występowania przeciwciał pANCA ze stopniem ekspresji białek Hsp70 i Hsc70. Z przytaczanych wcześniej badań wynika wyraźny związek ekspresji tych białek z układem immunologicznym błony śluzowej jelita grubego. Czynnikiem silnie stymulującym ekspresję Hsp70 są cytokiny produkowane przez limfocyty Th blaszki właściwej, podczas gdy sąsiadujące limfocyty B

produkują przeciwciała pANCA. Na ekspresję białek Hsp70 oraz na produkcję przeciwciał pANCA istotny wpływ mają przypuszczalnie także bakterie bytujące w świetle jelita grubego. Pomimo tych podobieństw na poziomie mechanizmów regulacyjnych, w prezentowanej rozprawie nie wykazano istotnych statystycznie korelacji występowania przeciwciał pANCA i ekspresji białka Hsp70. Zaobserwowano natomiast istotną statystycznie, przeciętną korelację obecności pANCA z ekspresją Hsc70 w komórkach nabłonkowych. Występowanie przeciwciał pANCA jest cechą stałą dla danego chorego. Prawdopodobnie są one wykrywalne jeszcze przed rozpoznaniem choroby i pozostają obecne przez cały jej okres. Potwierdzono nawet, iż pANCA nie zanikają po zabiegu proktokolektomii [145]. Ekspresja białka Hsp70, w przeciwieństwie do występowania pANCA, wykazuje znaczną zmienność przez okres choroby i, jak udowodniono w niniejszym badaniu, jest związana z jej aktywnością. Przytoczone powyżej różnice mogą wyjaśniać, dlaczego nie stwierdzono jakiegokolwiek korelacji tych parametrów. W prezentowanej tu rozprawie podkreślano już wcześniej, że ekspresja Hsc70 jest z kolei konstytutywna i nie wykazuje żadnej dynamiki zależnej od aktywności choroby w danym okresie. Zaobserwowano jednak istotne różnice ekspresji Hsc70 w komórkach nabłonkowych pomiędzy osobami chorującymi na WZJG a zdrowymi. Dodatnia korelacja obecności przeciwciał pANCA i ekspresji Hsc70 w komórkach nabłonkowych sugeruje związek tych parametrów. Na podstawie dostępnej wiedzy oraz wyników przeprowadzonego badania trudno jednak stwierdzić dokładny mechanizm tej korelacji. Najbardziej prawdopodobne wydaje się, że istnieje wspólne uwarunkowanie, być może genetyczne, decydujące o obecności przeciwciał pANCA oraz o wyższej ekspresji białka Hsc70. Podobnych badań, w których poszukiwano by korelacji ekspresji Hsp70 i Hsc70 z obecnością przeciwciał pANCA, brakuje w dotychczasowej literaturze, co uniemożliwia konfrontację zaobserwowanych prawidłowości z innymi publikacjami. Uzyskane wyniki wydają się natomiast warte weryfikacji i poszerzenia, co czyni je interesującym punktem wyjścia do dalszych badań na ten temat.

Przeciwciała GAB, podobnie jak pANCA, zostały opisane około pół wieku temu i już wtedy próbowano je powiązać z patogenezą WZJG, podejrzewając wręcz, że są one głównym czynnikiem wywołującym chorobę [146]. W kolejnych latach, mimo wielu prowadzonych na ten temat badań, nie udało się jednak udowodnić takiego związku. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku Folwaczny i wsp. wykazali natomiast, iż

stwierdzenie przeciwciał GAB u zdrowych krewnych pierwszego stopnia pacjentów z WZJG sugeruje istotnie wyższe ryzyko zachorowania tych osób w przyszłości [44]. GAB to przeciwciała skierowane przeciwko mukopolisacharydom produkowanym przez komórki kubkowe jelita [43]. W niedawno opublikowanej pracy Ichikawa i wsp. zidentyfikowali komórki B produkujące przeciwciała GAB w strefie brzeżnej śledziony. Antygen docelowy w postaci mucyny 2 dociera tam przypuszczalnie w kompleksie z komórką dendrytyczną drogą krwi i inicjuje produkcję przeciwciał, choć do tej pory nie potwierdzono tego faktu. Autorzy zaobserwowali także, że część limfocytów B produkujących przeciwciała GAB przemieszcza się wraz z krwią do ściany jelita i osiedla się w blaszce właściwej błony śluzowej. W badaniu nie potwierdzono jednak tezy, jakoby produkcja przeciwciał GAB w którejkolwiek z tych lokalizacji mogła zainicjować proces zapalny jelita grubego [147]. Podobnie jak w przypadku przeciwciał pANCA, w przedstawianej pracy doktorskiej badano ewentualne korelacje występowania przeciwciał GAB z ekspresją białek Hsp70 i Hsc70. Także w tym przypadku taka analiza została przeprowadzona przypuszczalnie po raz pierwszy, nie znaleziono bowiem żadnych wcześniejszych publikacji o podobnej tematyce. Zaobserwowano istotną statystycznie, dodatnią korelację występowania GAB z ekspresją Hsp70 w komórkach nabłonka. Pozostałe obserwowane korelacje nie były statystycznie istotne. W przeprowadzonym badaniu wykazano także dodatnią, przeciętną korelację obecności przeciwciał GAB z aktywnością choroby według skali montrealskiej. Korelacja GAB z zasięgiem choroby nie była istotna statystycznie. Wykazane zależności wymagają potwierdzenia i wyjaśnienia w dalszych badaniach. Z jednej strony, ekspresja Hsp70 jest bardzo zmienna – jak wcześniej opisywano, wzrasta znamienne w okresie ostrego rzutu choroby. Z tego powodu prawdopodobniejsze wydawało się stwierdzenie zależności między obecnością przeciwciał a ekspresją bardziej konstytutywnego białka Hsc70, tak jak to wykazano w przypadku przeciwciał pANCA. Z drugiej strony, udowodniono, także w niniejszym badaniu, iż nawet w okresie remisji WZJG ekspresja białka Hsp70 utrzymuje się na wyższym poziomie niż u osób zdrowych. Dzieje się tak najprawdopodobniej za sprawą zmienionej w stosunku do osób bez WZJG aktywności układu immunologicznego w obrębie błony śluzowej jelita grubego. Jednym z wyrazów tej aktywności jest właśnie produkcja przeciwciał GAB przez limfocyty B blaszki właściwej, choć należy mieć na uwadze fakt, że zjawisko to dotyczy jedynie 20-25% chorych. Być może, podobnie jak rozważano w przypadku związku występowania przeciwciał pANCA i ekspresji białka Hsc70, w patogenezie

WZJG istnieje jakieś uwarunkowanie decydujące równocześnie o obecności przeciwciał GAB i wyższej ekspresji białka Hsp70. Inną możliwością wytłumaczenia stwierdzonej korelacji jest ewentualna stymulacja nadekspresji białka Hsp70 przez przeciwciała GAB. Na osobną uwagę zasługuje korelacja występowania przeciwciał GAB z aktywnością choroby ocenianą w skali montrealskiej. Celem tej analizy była orientacyjna ocena ewentualnego związku obecności w surowicy przeciwciał GAB z przebiegiem klinicznym WZJG. Skala montrealaska pozwala wprawdzie ocenić aktualny stan pacjenta, przyjęto jednak, iż stwierdzenie ciężkiego lub średnio ciężkiego rzutu choroby wiąże się zwykle z poważniejszym jej przebiegiem. W prezentowanym badaniu własnym nie spodziewano się wykazania korelacji występowania przeciwciał GAB z aktywnością choroby. W badaniach ostatnich lat nie zaobserwowano bowiem związku występowania przeciwciał GAB z cięższym przebiegiem choroby [148, 149, 150]. Stwierdzenie w przedstawianej pracy istotnej statystycznie korelacji jest więc pewnym zaskoczeniem i sugeruje zasadność dalszych badań na ten temat.

#### **5.6. Ocena zależności ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 ze wskaźnikami stanu zapalnego**

W badaniu własnym poszukiwano także ewentualnych korelacji powszechnie oznaczanych wskaźników stanu zapalnego, takich jak CRP, OB czy WBC z ekspresją białek Hsp70 i Hsc70. Nie wykazano jednak żadnych zależności istotnych statystycznie. Zwłaszcza w przypadku ekspresji Hsp70 taka zależność wydawała się prawdopodobna, gdyż białko to wydaje się szczególnie dynamicznie odpowiadać wzrostem ekspresji w okresie aktywności choroby [92]. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że profil wzrostu ekspresji Hsp70 znacząco różni się od profilu zmian stężenia badanych markerów stanu zapalnego i, przypuszczalnie, u jego podłoża leżą inne mechanizmy. Badanie z jednej strony stężenia klasycznych wskaźników stanu zapalnego, a z drugiej ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 pozwala więc uzyskać różne informacje na temat aktywności WZJG, które mogą się wzajemnie uzupełniać w praktyce klinicznej.



## 6. WNIOSKI

- 6.1. Ekspresja białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego blaszki właściwej błony śluzowej, podobnie jak ekspresja białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych jest istotnie wyższa u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego w porównaniu z osobami zdrowymi.
- 6.2. Ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 nie wykazuje korelacji z aktywnością i zasięgiem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego sklasyfikowanymi według skali montrealskiej. Ekspresja białka Hsp70 u chorych w okresie remisji jest wyższa niż u zdrowej populacji w komórkach nacieku zapalnego. Populacja chorych z ostrym rzutem choroby w porównaniu z osobami zdrowymi charakteryzuje się wyższą ekspresją Hsp70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego, a także wyższą ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych.
- 6.3. Występowanie przeciwciał pANCA w surowicy chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego nie koreluje z ekspresją białka Hsp70. Stwierdzenie tych przeciwciał wykazuje natomiast dodatnią korelację z ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych. Występowanie przeciwciał GAB koreluje dodatnio z ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych, lecz nie w komórkach nacieku zapalnego. Ekspresja białka Hsc70 nie wykazuje korelacji z obecnością przeciwciał GAB oraz stężeniem białka C-reaktywnego, odczynem Biernackiego czy leukocytozą.
- 6.4. Przeciwciała pANCA w surowicy chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego nie wykazują korelacji z aktywnością ani zasięgiem choroby ocenianymi według skali montrealskiej, natomiast obserwuje się dodatnią korelację obecności przeciwciał GAB z aktywnością choroby, lecz nie z jej zasięgiem.

## 7. PIŚMIENICTWO

[1] Dignass A., Eliakim R., Magro F. i wsp. Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2012.

[2] Shivananda S., Lennard-Jones J., Logan R. i wsp. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: Is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697.

[3] Arias-Loste M., Castro B., Rivero M. i wsp. Epidemiology of intrafamilial inflammatory bowel disease throughout Europe. *Ann Gastroenterol* 2012;25(3):188-192.

[4] Langholz E. Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. *Ther Adv Gastroenterol* 2010;3(2):77-86.

[5] Loftus E. Jr. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517.

[6] Vind I., Riis L., Jess T. i wsp. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn's Colitis Database. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1274-1282.

[7] Lapidus A. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. *World J Gastroenterol* 2006;12:75-81.

[8] Loftus E., Sandborn W. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:1-20.

- [9] Langholz E., Munkholm P., Nielsen O. i wsp. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:1247-1256.
- [10] Iwańczak B., Iwańczak F. Zmienność epidemiologiczna i kliniczna nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żywnie Dziecka* 2009;11(2):63-66.
- [11] Wiercińska-Drapało A., Jaroszewicz J., Flisiak R. i wsp. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol* 2005;11(17):2630-2633.
- [12] Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2011. Wyd. Medycyna Praktyczna. Kraków 2011.
- [13] Tysk C., Lindberg E., Jarnerot G. i wsp. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-996.
- [14] Sartor R. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3(7):390-407.
- [15] Baumgart D., Carding S. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-1640.
- [16] Bouma G., Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3(7):521-533.
- [17] Fuss I., Neurath M., Boirivant M. i wsp. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- $\gamma$ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-1270.

- [18] Fuss I., Heller F., Boirivant M. i wsp. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical TH2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497.
- [19] Sartor R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3(7):390-407.
- [20] Hus I., Maciąg E., Roliński J. Znaczenie limfocytów Th17 w odporności przeciwnowotworowej. *Postępy Hig Med Dośw* 2010;64:244-250.
- [21] Cătană C., Neagoe I., Vasile Cozma V. i wsp. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015;21(19):5823-5830.
- [22] Lees C., Barrett J., Parkes M. i wsp. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011;60:1739-1753.
- [23] Smythies L., Sellers M., Clements R. i wsp. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005;115(1):66-75.
- [24] Ghosh S., Goldin E., Gordon F. i wsp. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:24-32.
- [25] Feagan B., Greenberg G., Wild G. i wsp. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the  $\alpha 4\beta 7$  integrin. *N Engl J Med* 2005;352:2499-2507.
- [26] Boyko E., Koepsell T., Perera D. i wsp. Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *N Engl J Med* 1987;316:707-710.
- [27] Karczewski J., Poniedziałek B., Rzymski P. i wsp. The effect of cigarette smoking on the clinical course of inflammatory bowel disease. *Prz Gastroenterol* 2014;9(3):153-159.

- [28] Pullan R., Rhodes J., Ganesh S. i wsp. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994;330:811-815.
- [29] Thomas G., Rhodes J., Ragunath K. i wsp. Transdermal nicotine compared with oral prednisolone therapy for active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:769-776.
- [30] Chan S., Luben R., van Schaik F. i wsp. Carbohydrate intake in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(11):2013-2021.
- [31] Geerling B., Dagnelie P., Badart-Smook A. i wsp. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95(4):1008-1013.
- [32] Ananthakrishnan A., Khalili H., Konijeti G. i wsp. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2014;63(5):776-784.
- [33] Wurzelmann J., Lyles C., Sandler R.S. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994;39(3):555-560.
- [34] Liu Y., van Kruiningen H., West A. i wsp. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396-1404.
- [35] Li-Xuan Sang, Bing Chang, Wen-Liang Zhang i wsp. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(15):1908-1915.
- [36] Sartor R. Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):577-94.

[37] Wakefield A., Sawyerr A., Hudson M. i wsp. Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1991; 36(8):1147-1150.

[38] Vecchi M., Spina L., Cavallaro F. i wsp. Do antibodies have a role in IBD pathogenesis? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(Suppl 2):95-96.

[39] van Schaik F., Oldenburg B., Hart A. i wsp. Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut* 2013;62:683-688.

[40] Reese G., Constantinides V., Simillis C. i wsp. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101(10):2410-2422.

[41] Lerner A., Shoenfeld Y. Serological markers in inflammatory bowel disease: the pros and cons. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(2):103-105.

[42] Zawadzka P., Szczepański M., Łykowska-Szuber L. i wsp. Rola autooprzeciwciał w diagnostyce i różnicowaniu nieswoistych zapaleń jelit. *Alergia Astma Immun* 2006;11(3):155-161.

[43] Hahm K., Im Y., Parks S. i wsp. Loss of transforming growth factor  $\beta$  signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49(2):190-198.

[44] Folwaczny C., Noehl N., Tschop K. i wsp. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 1997;113:101-106.

[45] Török H., Folwaczny C. Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a feasible diagnostic tool? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17(1):37-39.

[46] Odze R. Pathology of indeterminate colitis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(Suppl 5):36-40.

[47] Joossens S., Reinisch W., Vermeire S. i wsp. The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 2002;122:1242-1247.

[48] Dignass A. i wsp. Second EUROPEAN evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis, *Journal of Crohn's and Colitis* 2012.

[49] Grzymisławski M., Derc K., Sobieska M. i wsp. Microheterogeneity of acute phase proteins in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006;12(32):5191-5195.

[50] de Villiers W., Varilek G., de Beer F. i wsp. Increased serum amyloid a levels reflect colitis severity and precede amyloid formation in IL-2 knockout mice. *Cytokine* 2000;12(9):1337-1347.

[51] Bartnik W. i wsp. Atlas kliniczno-patologiczny nieswoistych chorób zapalnych jelit. Poznań 2011.

[52] Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Prz Gastroenterol* 2007;2(5).

[53] Satsangi J., Silverberg M., Vermeire S. i wsp. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55(6):749-753.

[54] Chambers T., Morson B. The granuloma in Crohn's disease. *Gut* 1979;20:269-274.

[55] Geboes K. What histologic features best differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(Suppl 2):168-169.

[56] Jenkins D., Balsitis M., Gallivan S. i wsp. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J Clin Pathol* 1997;50:93-105.

[57] Seldenrijk C., Morson B., Meuwissen S. i wsp. Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 1991;32:1514-1520.

[58] Riley S., Mani V., Goodman M. i wsp. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;32:174-178.

[59] Zagórowicz E. Rak jelita grubego w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Gastroent Klin* 2012;4(3): 83- 88.

[60] Zagórowicz E., Albrecht P., Bartnik W. i wsp. Rekomendacje Sekcji Jelitowej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące aminosalicylanów we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego oraz dotyczące chemoprewencji raka jelita grubego w tej chorobie. *Gastroent Klin* 2010;2(2):41-48.

[61] Laharie D., Bourreille A., Branche J. i wsp. Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380(9857):1909-1915.

[62] Dignass A. i wsp. Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Current management, *Journal of Crohn's and Colitis* 2012.

[63] Dobrowolska-Zachwieja A., Jakubowska-Burek L. Profits from biological treatment in inflammatory bowel disease patients. *Prz Gastroenterol* 2010;2:68-76.

[64] Eder P., Łodyga M., Łykowska-Szuber L. i wsp. Wytyczne Grupy Roboczej Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii i Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii



dotyczące postępowania z pacjentem z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. *Prz Gastroenterol* 2013;8(1):1-20.

[65] McLean L., Shea-Donohue T., Cross R. Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Immunotherapy* 2012;4(9):883-898.

[66] Sha S., Liang J., Chen M. i wsp. Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther* 201;39(10):1003-1032.

[67] Borges T.J., Wieten L., van Herwijnen M.J. i wsp. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 2012;3:95.

[68] Ritossa F.A. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-573.

[69] Tissières A., Mitchell H.K., Tracy U. i wsp. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974;84:389-398.

[70] Lindquist S. The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986;55:1151-1191.

[71] Pockley A.G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003;362(9382):469-476.

[72] Kazula A., Kazula E. Stymulacja aktywności białek szoku cieplnego jako nowy kierunek terapii. *Farm Pol* 2009;65(10):697-706.

[73] Binder R.J., Vatner R., Srivastava P. i wsp. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 2004;64(4):442-451.

[74] Mizushima Y. Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;276:352-359.

[75] Kowalczyk D.W. Szczepionki terapeutyczne w raku nerki. *Współczesna Onkol.* 2007;11(3):160-166.

[76] Mackiewicz J., Mackiewicz A. Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Współczesna Onkol.* 2010;14(2):59-71.

[77] Cappello F., Conway de Macario E., Di Felice V. i wsp. Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. *PLoS Pathog* 2009;5(8):e1000552.

[78] Res P.C., Schaar C.G., Breedveld F.C. i wsp. Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet.* 1988;2(8609):478-480.

[79] Salvetti M., Buttinelli C., Ristori G. i wsp. T-lymphocyte reactivity to the recombinant mycobacterial 65- and 70-kDa heat shock proteins in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 1992;5(6):691-702.

[80] Chodisetti S., Rai P., Gowthaman U. i wsp. Potential T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* that can instigate molecular mimicry against host: implications in autoimmune pathogenesis. *BMC Immunol* 2012;13:13.

[81] Van Eden W., Thole J., van der Zee R. i wsp. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 1988 Jan 14;331(6152): 171-173.

[82] Stricher F., Macri Ch., Ruff M. i wsp. HSPA8/HSC70 chaperone protein. Structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 2013;9(12):1937-1954.

[83] Łabędzka K., Izdebska M. Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig Med Dośw* 2006;60:439-446.

[84] Kampinga H., Hageman J., Vos M. i wsp. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009;14:105-111.

[85] Mayer M., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:670-678.

[86] Bertelsen E., Zhou H., Lowry D. i wsp. Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution. *Protein Sci* 1999; 8:343-54.

[87] Swan C., Evans T., Sylvain N. i wsp. Zebrafish HSF4: a novel protein that shares features of both HSF1 and HSF4 of mammals. *Cell Stress & Chaperones* 2012;17(5):623-637.

[88] Yeh F., Hsu L., Lin B. i wsp. Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. *Biochimie* 2006;88(12):1983-1988.

[89] Luo X., Zuo X., Zhang B. i wsp. Release of heat shock protein 70 and the effects of extracellular heat shock protein 70 on the production of IL-10 in fibroblast-like synoviocytes. *Cell Stress Chaperones* 2008;13:365-373.

[90] Luo X., Zuo X., Zhou Y. i wsp. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R41.

[91] Tukaj S., Lipińska B. Białka szoku termicznego w reumatoidalnym zapaleniu stawów: przyjaciel czy wróg? *Postępy Hig Med Dośw* 2011;65:427-436.

[92] Galazka G., Jurewicz A., Domowicz M. i wsp. HINT1 peptide/Hsp70 complex induces NK-cell-dependent immunoregulation in a model of autoimmune demyelination. *Eur J Immunol* 2014;44(10):3026-3044.

[93] Silva P., Furuya T., Braga I. i wsp. Analysis of HSPA8 and HSPA9 mRNA expression and promoter methylation in the brain and blood of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2014;38(1):165-170.

- [94] Zhang Z., Cheng Y. miR-16-1 promotes the aberrant  $\alpha$ -synuclein accumulation in parkinson disease via targeting heat shock protein 70. *Scientific World Journal* 2014;2014:938348.
- [95] Repalli J., Meruelo D. Screening strategies to identify HSP70 modulators to treat Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:321-331.
- [96] Chebotareva N., Neprintseva N., Bobkova I. i wsp. Investigation of 70-kDa heat shock protein in the serum and urine of patients with chronic glomerulonephritis. *Ter Arkh* 2014;86(6):18-23.
- [97] Marzec Ł., Zdrojewski Z., Bryl E. Białko szoku termicznego 72(Hsp72) w chorobach nerek. *Nefrol Dial Pol* 2007;11:78-82.
- [98] Yadav A., Kumar V., Jha V. Heat shock proteins 60 and 70 specific proinflammatory and cytotoxic response of CD4+CD28null cells in chronic kidney disease. *Mediators Inflamm* 2013;2013:384807.
- [99] Kojima K., Musch M.W., Ren H. i wsp. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(5):1395-1407.
- [100] Arvans D.L., Vavricka S.R., Ren H. i wsp. Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(4):696-704.
- [101] Sartor R.B. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol* 1997;148:567-576.

[102] Tao Y., Drabik K.A., Waypa T.S. i wsp. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Cell Physiol* 2006;290(4):1018-1030.

[103] Joshua J. Malago, Jos F.J.G. Koninkx, Hans H. i wsp. Ovelgönne. Expression levels of heat shock proteins in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to *Salmonella enteritidis*. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8(2):194-203.

[104] Deitch E., Beck S., Cruz N. i wsp. Induction of heat shock gene expression in colonic epithelial cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin. *Crit Care Med* 1995;23:1371-1376.

[105] Ropeleski M.J., Tang J., Walsh-Reitz M.M. i wsp. Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress. *Gastroenterology* 2003;124(5):1358-1368.

[106] Chen Y., Noble E. Is exercise beneficial to the inflammatory bowel diseases? An implication of heat shock proteins. *Med Hypotheses* 2009;72(1):84-86.

[107] Kasimay O., Güzel E., Gemici A. i wsp. Colitis-induced oxidative damage of the colon and skeletal muscle is ameliorated by regular exercise in rats: the anxiolytic role of exercise. *Exp Physiol* 2006;91(5):897-906.

[108] Melling C., Thorp D., Noble E. i wsp. Regulation of myocardial heat shock protein 70 gene expression following exercise. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37(4):847-855.

[109] Noble E., Ho R., Dzialoszynski T. i wsp. Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;187(4):495-501.

[110] Paroo Z., Haist J., Karmazyn M. i wsp. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 2002;90(8):911-917.

[111] Ohkawara T., Nishihira J., Ishiguro Y. i wsp. Resistance to experimental colitis depends on cytoprotective heat shock proteins in macrophage migration inhibitory factor null mice. *Immunol Lett* 2006;107(2):148-154.

[112] Tomasello G., Sciumè C., Rappa F. i wsp. Hsp10, Hsp70, and Hsp90 immunohistochemical levels change in ulcerative colitis after therapy. *Eur J Histochem* 2011;55(4):38.

[113] Ludwig D., Stahl M., Ibrahim E.T. i wsp. Enhanced intestinal expression of heat shock protein 70 in patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 1999;44(7):1440-1447.

[114] Otani S., Otaka M., Jin M. i wsp. Effect of preinduction of heat shock proteins on acetic acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1997;42(4):833-846.

[115] Ohkawara T., Nishihira J., Takeda H. i wsp. Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 2006;17(2):229-234.

[116] Ohkawara T., Takeda H., Nishiwaki M. i wsp. Protective effects of heat shock protein 70 induced by geranylgeranylacetone on oxidative injury in rat intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(3):312-317.

[117] Ohkawara T., Takeda H., Kato K. i wsp. Polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 2005;40(11):1321-1327.

[118] Ohkawara T., Nishihira J., Nagashima R. i wsp. Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: relevant to cytoprotective heat shock proteins. *World J Gastroenterol*. 2006;12(38):6178-6181.

[119] Qin Y., Naito Y., Handa O. i wsp. Heat shock protein 70-dependent protective effect of polaprezinc on acetylsalicylic acid-induced apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr* 2011;49(3):174-181.

[120] Burress G.C., Musch M.W., Jurivich D.A. i wsp. Effects of mesalamine on the Hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113(5):1474-1479.

[121] Xue H., Sufit A., Wischmeyer P. i wsp. Glutamine Therapy Improves Outcome of In Vitro and In Vivo Experimental Colitis Models. *J Parenter Enteral Nutr* 2011;35:188-197.

[122] Abou El Azm A., Yousef M., Kobtan A. i wsp. Colonic mucosal expression of heat-shock proteins may have a potential prognostic value in ulcerative colitis. *Arab J Gastroenterol* 2015;16(1):20-24.

[123] Tao Y., Hart J., Lichtenstein L. i wsp. Inducible heat shock protein 70 prevents multifocal flat dysplastic lesions and invasive tumors in an inflammatory model of colon cancer. *Carcinogenesis* 2009;30(1):175-182.

[124] Kim J., Kim Y., Kwon B. i wsp. The natural compound cantharidin induces cancer cell death through inhibition of heat shock protein 70 (HSP70) and Bcl-2-associated athanogene domain 3 (BAG3) expression by blocking heat shock factor 1 (HSF1) binding to promoters. *J Biol Chem* 2013;288(40):28713-28726.

[125] Choi D., Lim M., Lee J. i wsp. The Cytotoxicity of Kahweol in HT-29 Human Colorectal Cancer Cells Is Mediated by Apoptosis and Suppression of Heat Shock Protein 70 Expression. *Biomol Ther (Seoul)* 2015;23(2):128-133.

[126] Dai S., Jiang L., Wang G. i wsp. HSP70 interacts with TRAF2 and differentially regulates TNFalpha signalling in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med* 2010;14(3):710-725.

- [127] Matsuo K., Zhang X., Ono Y. i wsp. Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. *Brain Behav Immun* 2009;23(1):108-115.
- [128] Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F. i wsp. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118(2):229-241.
- [129] Ignys I., Piątkowska P., Roszak D. Mikroflora jelitowa a rozwój nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Nowiny Lekarskie* 2007;76(1):59-64.
- [130] Miazga A., Osiński M., Cichy W. i wsp. Current views on the etiopathogenesis, clinical manifestation, diagnostics, treatment and correlation with other nosological entities of SIBO. *Adv Med Sci* 2015;60(1):118-124.
- [131] Degowska M., Rydzewska G. Chemoprewencja raka jelita grubego – rola mesalazyny. *Prz Gastroenterol* 2008;3(5):247-254.
- [132] Ohkusa T., Kato K., Terao S., Chiba T., Mabe K., Murakami K. i wsp. Newly developed antibiotic combination therapy for ulcerative colitis: a double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1820-1829.
- [133] Khan K.J., Ullman T.A., Ford A.C., Abreu M.T., Abadir A., Abadir A. i wsp. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:661-673.
- [134] Hu S., Ciancio M.J., Lahav M. i wsp. Translational inhibition of colonic epithelial heat shock proteins by IFN-gamma and TNF-alpha in intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007;133(6):1893-1904.



[135] Vlachos I., Barbatis C., Tsopanomichalou M. i wsp. Correlation between depression, anxiety, and polymorphonuclear cells' resilience in ulcerative colitis: the mediating role of heat shock protein 70. *BMC Gastroenterol* 2014;14:77.

[136] Page N., Gros F., Schall N. i wsp. HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 2011;70:837-843.

[137] Faber V., Elling A.P. Leucocyte-specific antinuclear factor in patients with Felty's syndrome, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and other diseases. *Acta Med Scand* 1967;179:257-267.

[138] Targan S., Landers C., Cobb L. i wsp. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients. *J Immunol* 1995;155(6):3262-3267.

[139] Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006;52(2):171-181.

[140] Bahari A., Aarabi M., Hedayati M. i wsp. Target antigens for perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in Iranian patients with ulcerative colitis. *Middle East J Dig Dis* 2014;6(4):203-207.

[141] Waterman M., Knight J., Dinani A. i wsp. Predictors of Outcome in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21(9):2097-2105.

[142] Sandborn W., Landers C., Tremaine W. i wsp. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1996;71:431-436.

- [143] Sandborn W., Landers C., Tremaine W. i wsp. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:740-747.
- [144] Israeli E., Grotto I., Gilburd B., Balicer R.D., Goldin E., Wiik A. i wsp. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* 2005;54:1232-1236.
- [145] Patel R.T., Stokes R., Birch D. i wsp. Influence of total colectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 1994;81(5):724-726.
- [146] Broberger O., Perlmann P. Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J Exp Med* 1959;110: 657-674.
- [147] Ichikawa D., Asano M., Shinton S. i wsp. Natural Anti-Intestinal Goblet Cell Autoantibody Production from Marginal Zone B Cells. *J Immunol* 2015;194(2):606-614.
- [148] Kovacs M., Lakatos P., Papp M. i wsp. Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55(4):429-435.
- [149] Lawrance I., Hall A., Leong R. i wsp. A comparative study of goblet cell and pancreatic exocrine autoantibodies combined with ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:890-897.
- [150] Lakatos P., Altorjay I., Szamosi T. i wsp. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behaviour, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:365-374.

## 8. STRESZCZENIE

Białka szoku cieplnego 70 (Hsp70) są znane od bardzo dawna jako białka opiekuńcze, a więc sprawujące w tkankach funkcję ochronną oraz naprawczą w sytuacjach stresowych. Najlepiej opisanym białkiem z tej rodziny jest Hsp72, zwane także Hsp70. Jego ekspresja zmienia się w tkankach dynamicznie, zależnie od obecności czynników stresowych. Kolejnym, dobrze znanym białkiem z rodziny Hsp70, jest Hsc73, zwane też Hsc70, którego ekspresja jest opisywana od dawna jako niezmienna pod wpływem stresu. W ostatnich latach zainteresowanie budzi także ich rola w patogenezie chorób z autoagresji, w tym również we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (WZJG). Pojawiają się przypuszczenia, że dokładne poznanie mechanizmów regulujących ekspresję białek z rodziny Hsp w błonie śluzowej jelita grubego oraz ich wpływu na przebieg tych schorzeń może stać się podstawą nowych działań terapeutycznych. Liczba dostępnych obecnie publikacji na temat roli białek z rodziny Hsp70 w procesie chorobowym WZJG jest jednak wciąż niedostateczna, a wyniki najnowszych badań nie zawsze są ze sobą zgodne.

Wyznaczono sobie następujące cele pracy:

- ocena ekspresji białek Hsp70 i Hsc70 w błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z WZJG, a następnie porównanie ze zdrową populacją
- ocena korelacji ekspresji Hsp70 i Hsc70 z aktywnością i zasięgiem procesu zapalnego WZJG
- zbadanie korelacji stopnia ekspresji Hsp70 i Hsc70 z występowaniem autooprzeciwciał obserwowanych w przebiegu WZJG oraz ze wskaźnikami stanu zapalnego
- analiza występowania autooprzeciwciał pANCA i GAB u chorych na WZJG oraz ich korelacji z przebiegiem klinicznym choroby

Grupę badaną stanowiło 72 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2015, z czego 36 stanowili chorzy na WZJG, a pozostałych 36 pacjentów z wykluczonymi IBD stanowiło grupę kontrolną. Występowanie autooprzeciwciał oceniano za pomocą profilu przeciwciał jelitowych wykorzystującego metodę immunofluorescencji pośredniej. Ekspresję białek Hsp70 i Hsc70 oceniano metodą immunohistochemiczną na skrawkach parafinowych z wycinków błony śluzowej jelita

grubego pacjentów. Oceny dokonano w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego blaszki właściwej.

Wyniki aktualnej pracy pozwoliły na wyciągnięcie poniższych wniosków:

- ekspresja białka Hsp70 jest istotnie wyższa u chorych na WZJG w porównaniu z grupą kontrolną; białko Hsc70 wykazuje wyższą ekspresję u chorych tylko w komórkach nabłonkowych
- ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 nie wykazuje korelacji z aktywnością i zasięgiem WZJG wg skali montrealskiej; ekspresja białka Hsp70 u chorych w okresie remisji jest wyższa niż w zdrowej populacji w komórkach nacieku zapalnego
- występowanie przeciwciał pANCA w surowicy chorych na WZJG wykazuje dodatnią korelację z ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych; występowanie przeciwciał GAB koreluje dodatnio z ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych; wartości wskaźników stanu zapalnego nie wykazują korelacji z ekspresją badanych białek
- występowanie przeciwciał GAB wykazuje dodatnią korelację z aktywnością choroby

## 9. SUMMARY

Heat shock proteins 70 (Hsp70) are known for many years as molecular chaperons, an element protecting organism from various injuring factors. Hsp72, also known as Hsp70 is the best described protein in the family. Its expression increases rapidly, when some molecular stress factors occur. Another Hsp70 family member is Hsp73, also known as Hsc70, which expression is highly constitutive and stress-independent. Role of Hsp70 proteins in the pathogenesis of autoimmune diseases, including ulcerative colitis, is in the area of interest of recent studies. There is an assumption, that accurate recognition of mechanisms regulating Hsp70 proteins expression in colorectal epithelium and its influence on disease course, can help to achieve new treatment options. The actually available publications facing the problem of the role of Hsp70 proteins in ulcerative colitis is still insufficient.

The aims of recent study involved:

- the evaluation of Hsp70 and Hsc70 expression in colorectal epithelium of the patients with ulcerative colitis and its comparison with healthy patients
- the assessment of Hsp70 and Hsc70 expression correlation with the severity and extent degree of ulcerative colitis
- the evaluation of Hsp70 and Hsc70 proteins expression correlation with autoantibodies observed in ulcerative colitis patients, and with markers of inflammation
- analysis of pANCA and GAB antibodies occurrence in patients with ulcerative colitis and its correlation with disease course

Study group consisted of 72 patients hospitalized in the Department of Internal Medicine, Metabolism and Dietetics, Poznan University of Medical Sciences in years 2010- 2015. Study group included 36 patients with diagnosed ulcerative colitis and 36 healthy patients as a control group. Autoantibodies were assessed upon indirect immunofluorescence method. Hsp70 and Hsc70 expression were assessed in two cell populations (epithelium and inflammatory cells of lamina propria) upon immunohistochemistry method using paraffin-embalmed colorectal mucosa samples.

Based on the results the following conclusions were drawn:

- Hsp70 expression in colorectal epithelium is significantly higher in ulcerative colitis patients in comparison to control group; Hsc70 expression is significantly higher in ulcerative colitis patients only in epithelium
- no significant correlation of Hsp70 and Hsc70 expression with the degree of disease severity and extent, assessed with Montreal classification was found; Hsp70 expression in inflammatory cells was significantly higher in ulcerative colitis patients with the disease remission, compared to control group
- a significant, positive correlation of pANCA antibodies occurrence with Hsc70 expression in epithelium was found; a significant, positive correlation of GAB antibodies with Hsp70 expression in epithelium was found; inflammatory markers do not correlate with the expression of assessed proteins
- GAB antibodies occurrence correlated positively with degree of disease severity

## 10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Interakcje różnych czynników etiopatologicznych nieswoistych zapaleń jelit

Rycina 2. Ścieżka stymulacji limfocytów Th17 przez IL-23, z uwzględnieniem roli genów podatności na zachorowanie na nieswoiste zapalenia jelit oraz genów sprzyjających wystąpieniu także innych chorób z autoagresji

Rycina 3. Czynniki stymulujące wzrost ekspresji białka Hsp72 w błonie śluzowej jelita grubego

Rycina 4. Zmiany ekspresji białka Hsp72 oraz Hsc73 w błonie śluzowej jelita zależnie od aktywności WZJG

## 11. SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska aktywności choroby

Tabela 2. Klasyfikacja montrealaska zasięgu choroby

Tabela 3. Charakterystyka liczebności badanych grup pacjentów z uwzględnieniem płci

Tabela 4. Substraty zastosowane w profilu jelitowym

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna grupy badanej

Tabela 6. Ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego w grupie badanej

Tabela 7. Ekspresja białek Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego w grupie kontrolnej

Tabela 8. Korelacje pomiędzy ekspresją białka Hsp70 i Hsc70 w komórkach nabłonka i komórkach nacieku zapalnego w grupie badanej

Tabela 9. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych z aktywną chorobą z pacjentami w okresie remisji klinicznej

Tabela 10. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych z aktywną chorobą i w grupie kontrolnej

Tabela 11. Porównanie ekspresji badanych białek u chorych w okresie remisji klinicznej i w grupie kontrolnej

Tabela 12. Korelacje występowania autoprzeciwciał z badanymi białkami w grupie badanej

Tabela 13. Korelacje występowania autoprzeciwciał z aktywnością i zasięgiem choroby ocenianymi w skali montrealskiej w grupie badanej



## 12. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Porównanie ekspresji białka Hsp70 w grupie badanej i grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego

Wykres 2. Porównanie ekspresji białka Hsc70 w grupie badanej i grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego

Wykres 3. Porównanie ekspresji białka Hsp70 w grupie badanej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego

Wykres 4. Porównanie ekspresji białka Hsp70 w grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego

Wykres 5. Liczba pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsp70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego

Wykres 6. Porównanie ekspresji białka Hsc70 w grupie badanej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego

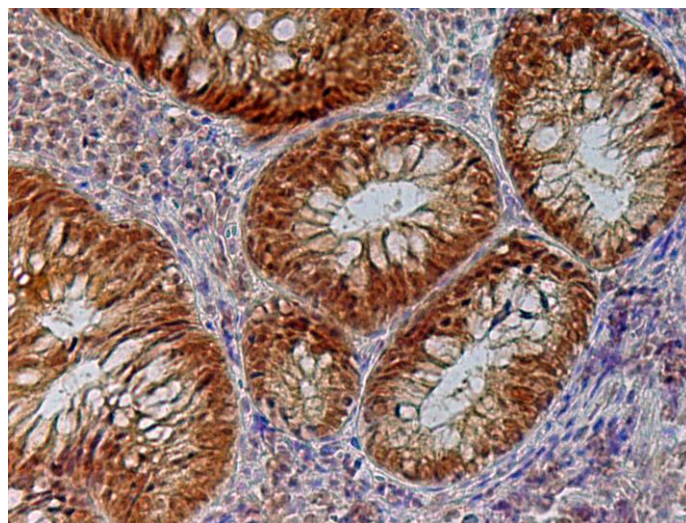
Wykres 7. Porównanie ekspresji białka Hsc70 w grupie kontrolnej w komórkach nabłonkowych i komórkach nacieku zapalnego

Wykres 8. Liczba pacjentów z poszczególną ekspresją białka Hsc70 w komórkach nabłonkowych oraz komórkach nacieku zapalnego

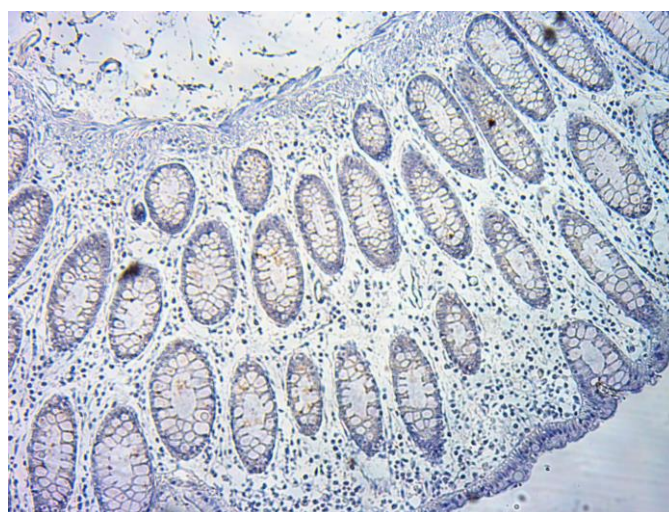
Wykres 9. Rozkład pacjentów z grup badanej i kontrolnej z poszczególnym poziomem ekspresji Hsp70 w podgrupie w okresie remisji choroby (skala montrealaska aktywności = 0) oraz w podgrupie w okresie rzutu choroby (skala montrealaska aktywności > 0)

Wykres 10. Rozkład pacjentów z grup badanej i kontrolnej z poszczególnym poziomem ekspresji Hsc70 w podgrupie w okresie remisji choroby (skala montrealaska aktywności = 0) oraz w podgrupie w okresie rzutu choroby (skala montrealaska aktywności > 0)

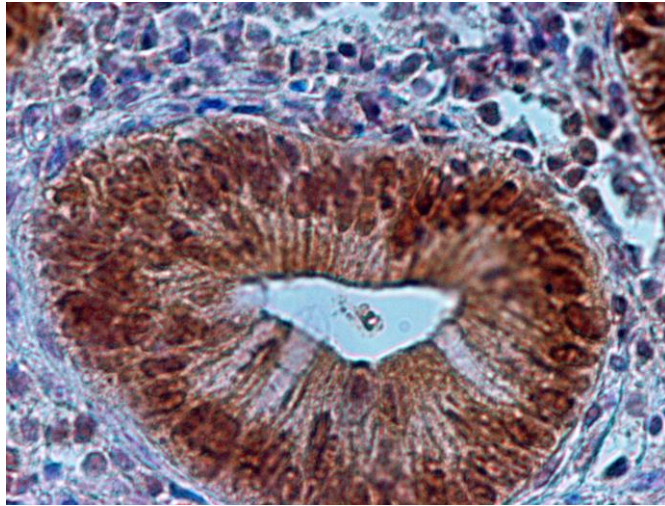
### 13. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA



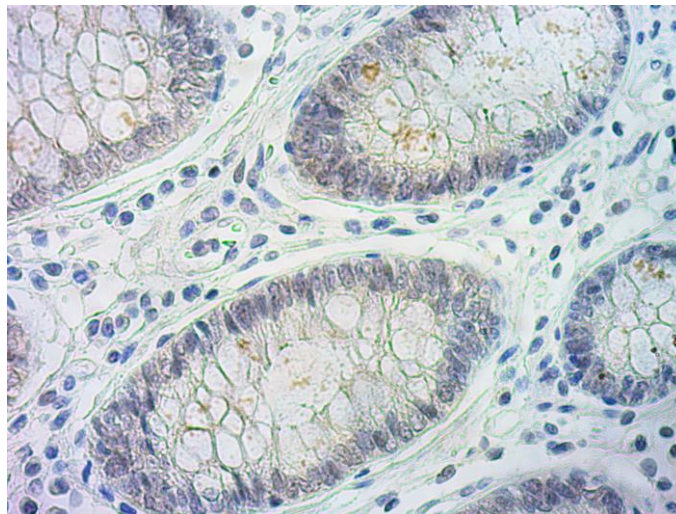
**Fot. 1.** Białko Hsp70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu niemal wszystkie widoczne w polu widzenia komórki nabłonkowe silnie wybarwione (ocena 3 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy badanej. Powiększenie 200 x.



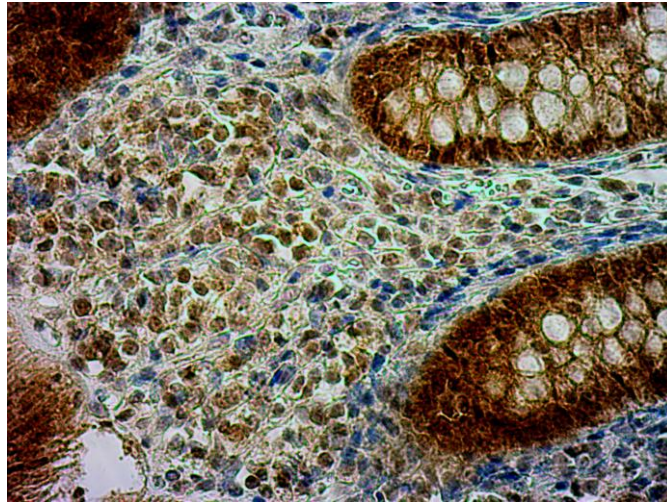
**Fot. 2.** Białko Hsp70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu pojedyncze widoczne w polu widzenia wybarwione komórki nabłonkowe (ocena 1 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy kontrolnej. Powiększenie 200 x.



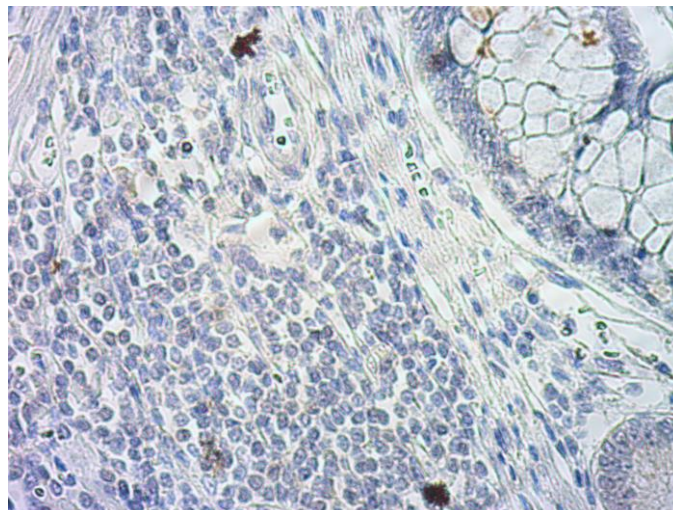
**Fot. 3.** Białko Hsc70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu niemal wszystkie widoczne w polu widzenia komórki nabłonkowe silnie wybarwione (ocena 3 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy badanej. Powiększenie 400 x.



**Fot. 4.** Białko Hsc70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu pojedyncze widoczne w polu widzenia wybarwione komórki nabłonkowe (ocena 1 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy kontrolnej. Powiększenie 400 x.



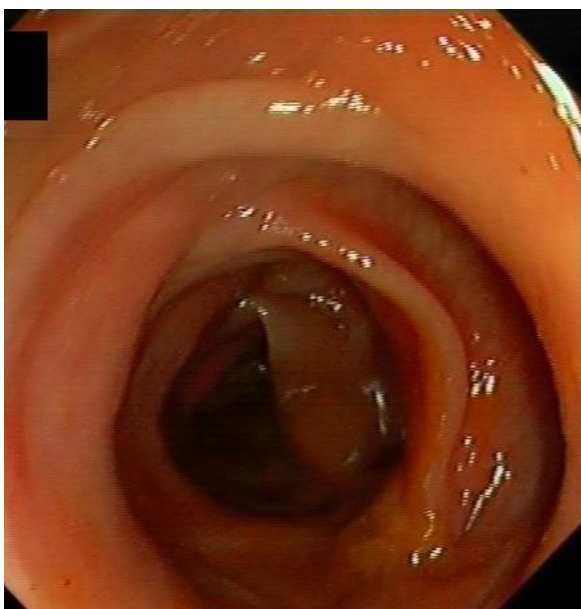
**Fot. 5.** Białko Hsp70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu wybarwione około 50% widocznych w polu widzenia komórek nacieku zapalnego (ocena 2 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy badanej. Powiększenie 200 x.



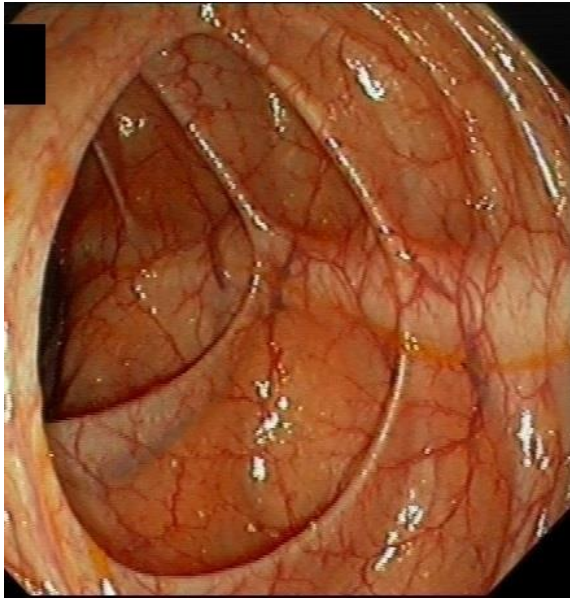
**Fot. 6.** Białko Hsc70 barwione metodą immunohistochemiczną. Na zdjęciu pojedyncze widoczne w polu widzenia wybarwione komórki nacieku zapalnego (ocena 1 w stosowanej skali). Preparat z biopsji jelita pacjenta z grupy kontrolnej. Powiększenie 400 x.



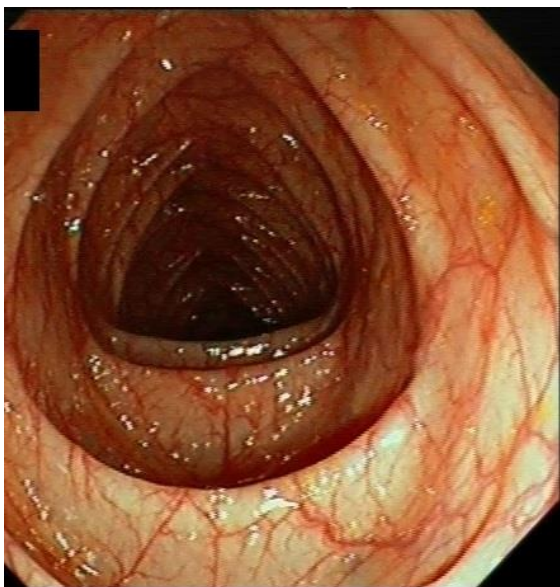
**Fot. 7.** Kolonoskopia – prawidłowy obraz makroskopowy odbytnicy pacjenta z grupy kontrolnej.



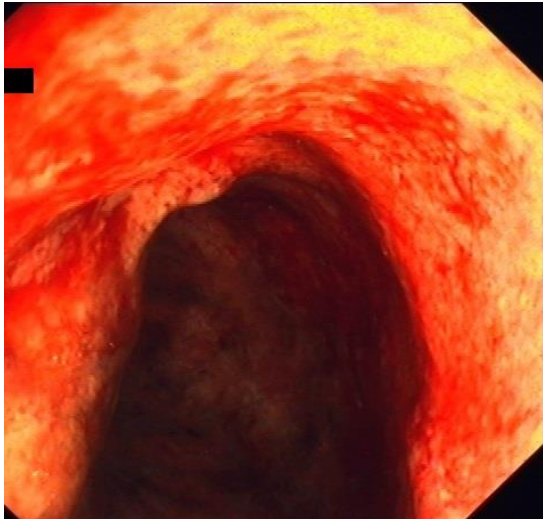
**Fot. 8.** Kolonoskopia – prawidłowy obraz makroskopowy esicy u pacjenta z grupy kontrolnej.



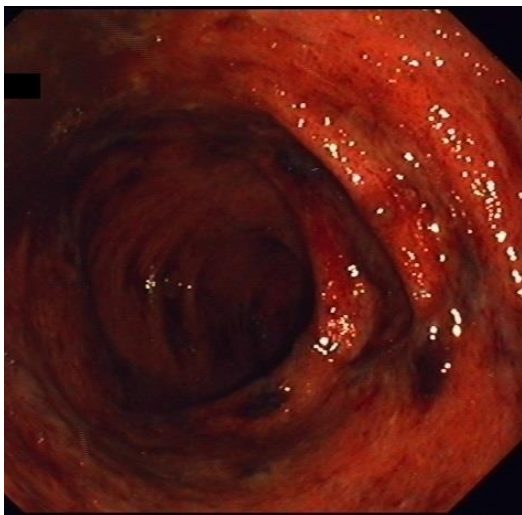
**Fot. 9.** Kolonoskopia – prawidłowy obraz makroskopowy zstępnicy u pacjenta z grupy kontrolnej.



**Fot. 10.** Kolonoskopia – prawidłowy obraz makroskopowy poprzecznicy u pacjenta z grupy kontrolnej.



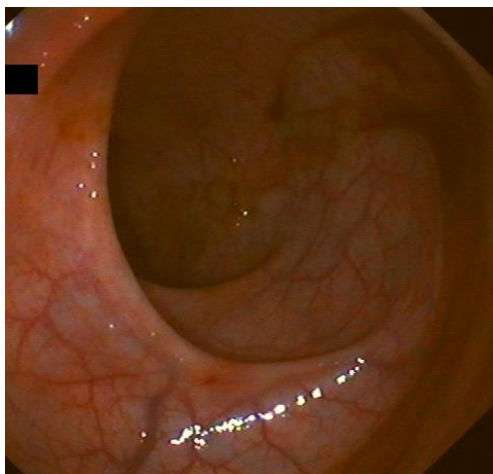
**Fot. 11.** Kolonoskopia – ostry rzut wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u pacjenta z grupy badanej, obraz błony śluzowej na granicy odbytnicy i esicy. Makroskopowo widoczne rozległe, aktywnie krwawiące owrzodzenia oraz zatarcie charakterystycznej dla odbytnicy siatki naczyńowej.



**Fot. 12.** Kolonoskopia – ostry rzut wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u pacjenta z grupy badanej, obraz błony śluzowej zstępującej. Widoczne makroskopowo liczne, aktywnie krwawiące owrzodzenia oraz wygładzenie charakterystycznych dla okrężnicy haustracji.

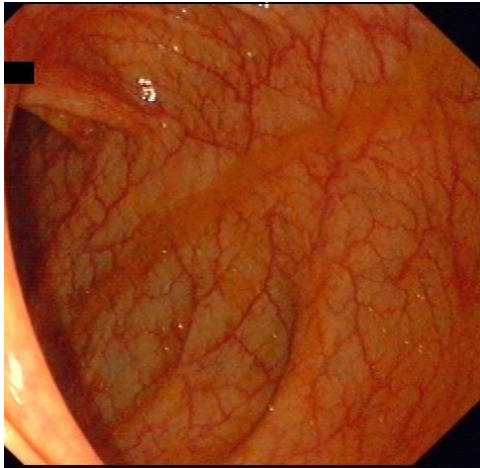


**Fot. 13.** Kolonoskopia – ostry rzut wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u pacjentki z grupy badanej, obraz błony śluzowej odbytnicy. Błona śluzowa jest obrzęknięta, z całkowitym zatarciem siatki naczyńowej, widoczne są pojedyncze owrzodzenia z aktywnym krwawieniem.

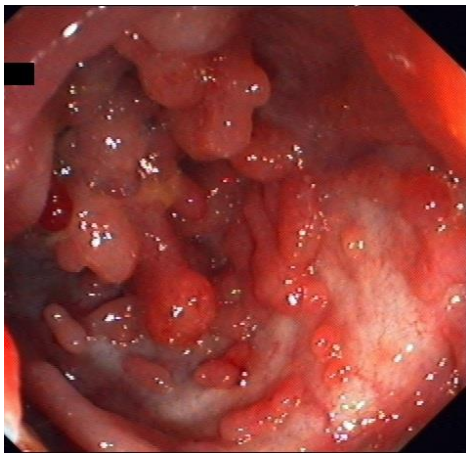


**Fot. 14.** Kolonoskopia – obraz błony śluzowej poprzecznicy u pacjentki z grupy badanej w trakcie ostrego rzutu choroby (obraz błony śluzowej odbytnicy tej samej chorej przedstawiono na fot. 13.). U chorej stwierdzono lewostronny zasięg choroby, więc zmiany zapalne występują wyłącznie dystalnie od zagięcia śledzionowego, podczas gdy błona śluzowa we wstępnicy i poprzecznicy ma prawidłowy wygląd makroskopowy (przedstawiony na fotografii).

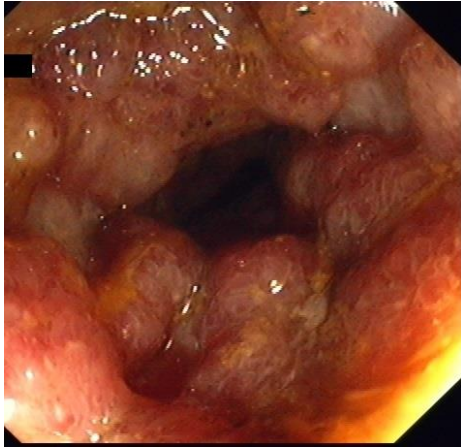




**Fot. 15.** Kolonoskopia – remisja kliniczna i endoskopowa wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u pacjentki z grupy badanej, prawidłowy obraz makroskopowy błony śluzowej odbytnicy.



**Fot. 16.** Kolonoskopia – przewlekłe zmiany powstałe w wyniku wieloletniego przebiegu zapalenia jelita grubego z częstymi, ciężkimi klinicznie, długotrwałymi zaostrzeniami. Widoczne liczne pseudopolipy oraz sztywna błona śluzowa odbytnicy z zatartą siatką naczyniową.



**Fot. 17.** Kolonoskopia – przewlekłe zmiany powstałe w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Widoczny znaczny obrzęk błony śluzowej z dużym zwężeniem światła odbytnicy, siatka naczyniowa zatarta. Z uwagi na obraz makroskopowy oraz brak wcześniejszego rozpoznania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wysunięto podejrzenie rozrostu nowotworowego, którego jednak nie potwierdziła ocena histologiczna wycinków. W późniejszym okresie pacjent został poddany resekcji jelita grubego z powodu niemożności uzyskania remisji za pomocą farmakoterapii oraz nawracającej niedokrwistości wymagającej przetoczeń preparatów krwiopochodnych. Ostateczna ocena histologiczna preparatu operacyjnego potwierdziła zaawansowane zmiany w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i wykluczyła rozrost nowotworowy.

