

Rozprawa doktorska

***Analiza przydatności oznaczania laktoferyny
w kale jako markera aktywności choroby
Leśniowskiego-Crohna***

Lek. Katarzyna Waszak

Promotor: Dr hab. n. med. Piotr Eder

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Liliana Łykowska-Szuber

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Poznań, 2018

Pamięci

Wybitnego lekarza, inspirującego nauczyciela, wyjątkowego człowieka

Pana Prof. dr hab. n. med. Krzysztofa Linke

Wieloletniego Kierownika Katedry i Kliniki Gastroenterologii,

Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu.

Spis treści:	3
Wykaz użytych skrótów	6
1. WSTĘP	9
1.1 Charakterystyka choroby Leśniowskiego-Crohna (ChLC)	9
1.1.1 Rys historyczny	9
1.1.2 Epidemiologia choroby Leśniowskiego-Crohna	9
1.1.3 Etiologia choroby Leśniowskiego-Crohna	10
1.1.4 Objawy choroby Leśniowskiego-Crohna i przebieg kliniczny	15
1.2 Diagnostyka i ocena aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna	17
1.3 Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna	27
1.4 Charakterystyka kopromarkerów ze szczególnym uwzględnieniem laktoferyny	29
1.4.1 Charakterystyka laktoferyny	30
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	35
3. PACJENCI I METODY	36
3.1 Grupa badana	36
3.2 Metody	42
3.2.1 Ocena kliniczna	42
3.2.2 Badania biochemiczne	42
3.2.3 Ocena stężenia laktoferyny w kale	42
3.2.4 Ocena stężenia kalprotektyny w kale	44

3.2.5	Badania obrazowe i endoskopowe	44
3.2.6	Analiza przydatności diagnostycznej laktoferyny w kale w różnych lokalizacjach zmian zapalnych w ChLC	46
3.2.7	Analiza statystyczna	46
3.2.8	Zagadnienia etyczne	47
4.	WYNIKI	48
4.1	Charakterystyka całej grupy badanej	48
4.1.1	Statystyka opisowa	48
4.1.2	Analiza korelacji i krzywe ROC	50
4.1.3	Analiza wyników regresji wielorakiej	54
4.2	Charakterystyka grupy pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim – podgrupa L1	55
4.2.1	Statystyka opisowa	55
4.2.2	Analiza korelacji	57
4.3	Charakterystyka grupy pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie grubym – podgrupa L2	59
4.3.1	Statystyka opisowa	59
4.3.2	Analiza korelacji	60
4.4	Charakterystyka grupy pacjentów z lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim i grubym – podgrupa L3	62
4.4.1	Statystyka opisowa	62
4.4.2	Analiza korelacji	63
4.5	Porównanie wybranych parametrów oceniających aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna w zależności od lokalizacji zmian zapalnych	65

4.6 Porównanie wartości stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby określonej za pomocą CDAI	66
5. DYSKUSJA	68
6. WNIOSKI	80
7. STRESZCZENIE	81
8. SUMMARY	84
9. PIŚMIENNICTWO	87
10. SPIS RYCIN I TABEL	102
10.1 Spis rycin	102
10.2 Spis tabel	103

Wykaz użytych skrótów

Skrót	Opis
5-ASA	kwas 5-aminosalicylowy
AUC	pole powierzchni pod krzywą (ang. <i>the area under the curve</i>)
CDAI	indeks aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. <i>Crohn's Disease Activity Index</i>)
CDEIS	endoskopowy indeks nasilenia aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. <i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i>)
CE	endoskopia kapsułkowa (ang. <i>capsule endoscopy</i>)
ChLC	choroba Leśniowskiego-Crohna
CI	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i>)
CT	tomografia komputerowa (ang. <i>computed tomography</i>)
ECCO	Europejska Organizacja Choroby Leśniowskiego-Crohna i Wrzodziejącego Zapalenia Jelita Grubego (ang. <i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>)
FC	kalprotektyna w stolcu (ang. <i>fecal calprotectin</i>)
Fe	żelazo
FL	laktoferyna w stolcu (ang. <i>fecal lactoferrin</i>)
GCDAS	całkowita aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. <i>Global Crohn's Disease Activity Score</i>)
GKS	glikokortykosteroidy

Skrót	Opis
Hgb	hemoglobina
IBS	zespół jelita drażliwego (ang. <i>Irritable Bowel Syndrome</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
MH	wygojenie błony śluzowej (ang. <i>mucosal healing</i>)
MPO	mieloperoksydaza
MR	rezonans magnetyczny (ang. <i>magnetic resonance</i>)
MRE	enterografia rezonansu magnetycznego (ang. <i>magnetic resonance enterography</i>)
NChZJ	nieswoiste choroby zapalne jelit
OB	odczyn Biernackiego
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polimerase chain reaction</i>)
PLT	liczba płytek krwi
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SEAS-CD	prosty indeks oceniający aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna w enterografii MR (ang. <i>Simple Enterographic Activity Score for Crohn's Disease</i>)
SES-CD	prosty indeks oceny aktywności endoskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. <i>Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease</i>)
TIBC	całkowita zdolność wiązania żelaza (ang. <i>total iron binding capacity</i>)
TNF-alfa	czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)

Skrót	Opis
TRUS	ultrasonografia przezodbytnicza (ang. <i>transrectal ultrasonography</i>)
UIBC	utajona zdolność wiązania żelaza (ang. <i>unsaturated iron binding capacity</i>)
USG	badanie ultrasonograficzne
WBC	liczba krwinek białych (ang. <i>white blood cell count</i>)
WZJG	wrzodziejące zapalenie jelita grubego

1. WSTĘP

1.1 Charakterystyka choroby Leśniowskiego-Crohna

1.1.1 Rys historyczny

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC) należy do grupy chorób określanych jako nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ). Pierwsze wzmianki o tej chorobie pojawiły się już w XVIII wieku. Autorem opisu przypadku 34-letniego chorego ze zmianami w postaci owrzodzeń oraz zwężeń w obrębie jelita cienkiego oraz grubego był Giambattista Morgagni. Jednak dopiero w XX wieku pojawiły się doniesienia naukowe opisujące nową jednostkę chorobową, nazwaną z uwagi na lokalizację zmian zapalnych *ileitis terminalis*. W październiku 1932 roku w czasopiśmie *Journal of the American Medical Association* ukazała się praca pod tytułem: „*Regional ileitis – a pathologic and clinical entity*”. Opisu 14 chorych ze zmianami zapalnymi końcowego odcinka jelita krętego, charakteryzującymi się obecnością ziarninaków nieserowaciejących w chorobowo zmienionej tkance, dokonali trzech lekarze - Burril Crohn, Gordon Openheimer oraz Leon Ginzburg z nowojorskiego szpitala *Mount Sinai Hospital*. Obecna nazwa choroby pochodzi od nazwiska jednego z odkrywców. Należy w tym miejscu jednak wspomnieć, że trzydzieści lat wcześniej - w 1903 roku - polski chirurg Antoni Leśniowski na łamach tygodnika „Medycyna” w pracy „Przyczynek do chirurgii kiszek” opisał przypadki nieznaney do tej pory choroby zapalnej jelit. Dlatego też w Polsce powszechnie stosuje się nazwę „choroba Leśniowskiego-Crohna”, podkreślając tym samym wkład polskiego lekarza w odkrycie tej jednostki chorobowej [1-3].

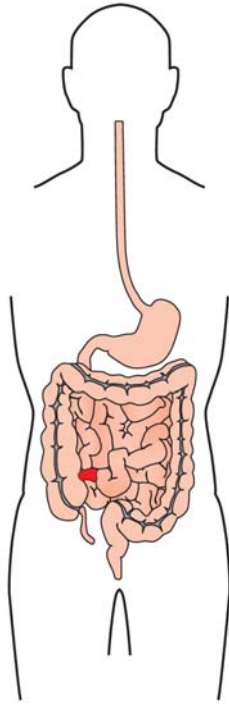
1.1.2 Epidemiologia choroby Leśniowskiego-Crohna

ChLC dotyczy głównie młodzieży oraz młodych dorosłych. Szczyt zachorowalności obserwuje się między 16 a 40 rokiem życia. Zapadalność wśród mężczyzn i kobiet jest podobna i stale rośnie. Według aktualnych danych epidemiologicznych wynosi ona od ok. 1 nowego przypadku na 100 tys. mieszkańców/rok w Grecji do 11,4 nowych przypadków na 100 tys. mieszkańców/rok w Szkocji [4]. Dużą zachorowalnością charakteryzują się kraje wysokorozwinięte i zurbanizowane, jednak największy wzrost zachorowalności

obserwuje się w krajach rozwijających się. W obszarach o wysokich współczynnikach zapadalności i chorobowości, jak Ameryka Północna oraz Europa Zachodnia i Północna odnotowuje się stabilizację w rozpowszechnieniu choroby. Natomiast w południowych regionach Ameryki oraz Europy aktualne badania wykazują przyrost populacji chorych na NChZJ [4-6]. Dokładne dane odnośnie do zapadalności w Polsce nie są dostępne. Próbę oszacowania wielkości populacji chorych na ChLC w Polsce podjęto tworząc „Rejestr Choroby Leśniowskiego-Crohna” pod patronatem konsultanta krajowego w zakresie gastroenterologii. W ramach Rejestru podmioty lecznicze z całego kraju, zajmujące się diagnostyką i leczeniem NChZJ, mogą zgłaszać chorych z rozpoznaną ChLC, z podaniem najważniejszych danych epidemiologicznych oraz klinicznych. Na dzień dzisiejszy zarejestrowanych jest ponad 6300 chorych. Uważa się jednak, że liczba ta jest niedoszacowana i w rzeczywistości jest znacznie większa [4, 7-10].

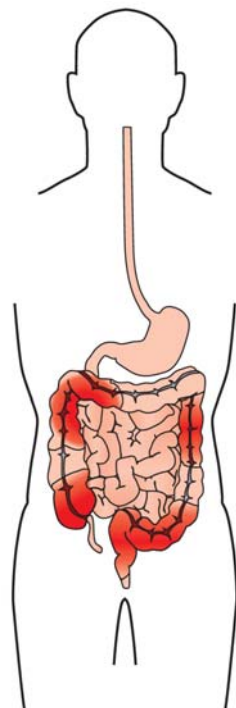
1.1.3 Etiologia choroby Leśniowskiego-Crohna

Istotą ChLC jest naciek zapalny obejmujący swym zasięgiem całą grubość ściany przewodu pokarmowego. Zmiany zapalne mogą lokalizować się w dowolnym odcinku przewodu pokarmowego. Najczęstszą lokalizacją zmian chorobowych jest końcowy odcinek jelita krętego zazwyczaj z zajęciem zastawki krętniczo-kątniczej i kątnicy. Nieco rzadziej proces chorobowy ogranicza się wyłącznie do jelita cienkiego czy grubego [2,4,11,12]. Najrzadziej obserwuje się zmiany chorobowe w górnym odcinku przewodu pokarmowego (Ryc. 1)



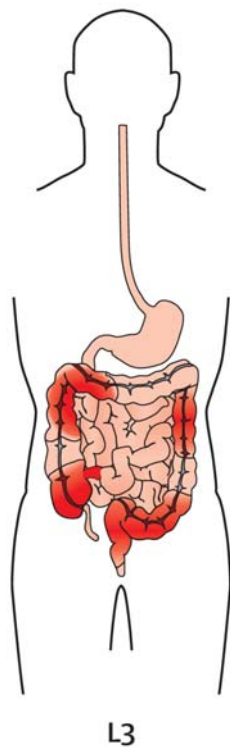
L1

Jelito cienkie
25-30%



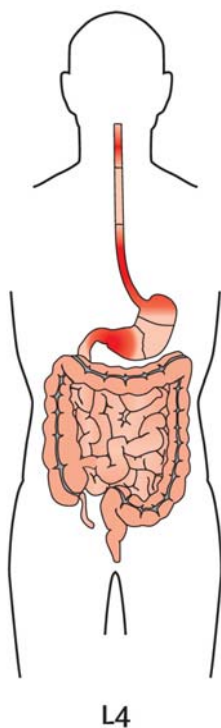
L2

Jelito grube
20%



Jelito cienkie oraz jelito grube

40-50%



Górny odcinek przewodu
pokarmowego

0,5-13%

Rycina 1. Lokalizacja zmian w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna w obrębie przewodu pokarmowego [Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. Lancet. 2012 Nov 3;380(9853):1595.]

Etiologia ChLC jest złożona, a ustalenie jednego czynnika sprawczego po dziś dzień jest niemożliwe. Do rozwoju zmian chorobowych najczęściej dochodzi jeśli nałoży się kilka czynników etiopatogenetycznych: środowiskowych, genetycznych oraz immunologicznych, podkreśla się także rolę mikrobioty jelitowej [1, 4, 11,12].

Badania populacyjne wskazują zwiększoną częstotliwość zachorowań u bliskich chorego na ChLC. Ryzyko wystąpienia ChLC u krewnych pierwszego stopnia jest większe ok. 14-15 razy w porównaniu do populacji ogólnej. Ryzyko to wzrasta u bliźniąt monozygotycznych i wynosi około 67% [4]. Dzięki rozwojowi metod inżynierii genetycznej w XXI wieku odkryto kilka genów, które mają związek z występowaniem ChLC. Najistotniejszą rolę w dziedziczeniu predyspozycji do zachorowania na ChLC przypisuje się genowi *NOD2* (*ang.* nucleotide binding oligomerisation domain) znanego obecnie jako *CARD15* (*ang.* caspase activating recruitment domain). Gen ten zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 16 (16q12, locus IBD1) [4,11,14,17,18]. *NOD2/CARD15* odpowiedzialny jest za kodowanie białka cytoplazmatycznego, które bierze udział w rozpoznawaniu bakteryjnych peptydoglikanów. Białko to ma także wpływ na metabolizm czynnika NFκB (*ang.* nuclear factor kappa-Beta), a co za tym idzie, pełni rolę w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Ryzyko rozwoju ChLC przy obecnej mutacji w jednym allelu genu *NOD2/CARD15* wzrasta ok. 2-4-krotnie w porównaniu do populacji ogólnej. Mutacja w dwóch allelach genu wiąże się ze znacznym ok. 40-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania. Mutacje w obrębie tego genu wiążą się także z wystąpieniem określonego fenotypu choroby, która rozpoczyna się zwykle w młodym wieku, zmiany najczęściej lokalizują się w jelicie krętym z tendencją do tworzenia zwężeń [4, 11, 14-18]. Innymi genami, w odniesieniu do których wykazano związek z wystąpieniem ChLC są *DLG5*, *SLC22A4* czy *SLC22A5* [4,11,14-18]. Gen *DLG5* jest odpowiedzialny za kodowanie białek strukturalnych komórki, których funkcja polega na zachowaniu ciągłości nabłonka. W razie mutacji w obrębie tego genu dochodzi do uszkodzenia bariery jelitowej. Natomiast geny *SLC22A4* oraz *SLC22A5* kodują przezbłonowe transportery karnityny i kationów organicznych, biorących udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych. Rolę w patogenezie ChLC wykazują także geny *ATG16L1*, *IL23R*, które na różnym poziomie biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej [4,11, 14-17]. Ludzki genom kryje w sobie wiele tajemnic, jego rola

w rozwoju ChLC jest niepodważalna i zapewne w tej dziedzinie pozostało jeszcze wiele do odkrycia.

Ważną rolę w patogenezie ChLC odgrywają także zaburzenia regulacji procesów immunologicznych – zarówno nieswoistych, jak i swoistych. W warunkach fizjologicznych przewód pokarmowy zaangażowany jest bowiem w niezwykle skomplikowane procesy rozpoznawania i eliminacji szeregu czynników, stanowiących zagrożenie dla homeostazy ludzkiego organizmu. Ściana jelita jest naturalną barierą oddzielającą krew od zawartości przewodu pokarmowego, w której znajdują się liczne bakterie, wirusy i toksyny. Mikrobiota jelitowa to m.in. ponad 10^{14} bakterii, których łączna masa wynosi ponad 2 kg. W jej skład wchodzi wiele mikroorganizmów, ale kluczowe znaczenie przypisuje się trzem gromadom bakterii - *Bacteroides*, *Firmicutes* oraz *Methanobrevibacter smithi* [4,11]. W populacji chorych na ChLC obserwuje się zmiany składu mikrobioty jelitowej głównie w postaci zwiększenia liczby bakterii Gram ujemnych, zwłaszcza bakterii gromady *Proteobacteria*, a w szczególności należącej do tej gromady - *E. coli*. Zaburzenia flory bakteryjnej mogą prowadzić do wzmożonej odpowiedzi immunologicznej wywołując zmiany zapalne w obrębie przewodu pokarmowego [1,4,11,12,17-20].

W patogenezie ChLC wykazano jednak niewłaściwą odpowiedź immunologiczną nie tylko na mikroorganizmy patogenne, ale także na własną, prawidłową florę bakteryjną. Szczegóły tych zjawisk są nadal przedmiotem badań. Wydaje się, że ważną rolę odgrywają tutaj komórki dendrytyczne, które w wyniku stymulacji antygenami bakteryjnymi wydzielają szereg cytokin, co skutkuje wzmożoną aktywacją wybranych subpopulacji limfocytów T i B, biorących udział w swoistej odpowiedzi immunologicznej. Innym efektem tych procesów jest migracja komórek - np. makrofagów - pośredniczących w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [4,11,18-22]. W efekcie dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy różnymi mechanizmami regulatorowymi reakcji zapalnych. W wyniku produkcji takich cytokin, jak interleukina-12 (IL-12), interferon-gamma (IFN- γ), czynnik martwicy nowotworów-alfa (*ang.* tumor necrosis factor-alpha - TNF- α), IL-23 czy IL-6, ma miejsce aktywacja limfocytów efektorowych Th1 oraz Th17. Z drugiej strony - funkcja limfocytów supresorowych, których przedstawicielem są limfocyty T_{reg}, jest osłabiona. Wyrazem tego są deficyty takich cytokin supresorowych, jak IL-10 i transformujący czynnik wzrostu-beta (*ang.* transforming growth factor-beta - TGF- β).

Przewaga cytokin prozapalnych nad supresorowymi oraz zachwianie procesów regulacji odpowiedzi immunologicznej prowadzi ostatecznie do powstania nieadekwatnie wyrażonego stanu zapalnego, który nie ulega – w przeciwieństwie do warunków fizjologicznych - samoograniczeniu [4,11,22-25].

Istotne znaczenie w patogenezie ChLC mają także czynniki środowiskowe. Częstym czynnikiem związanym z wystąpieniem zaostrzenia jest ekspozycja na stres. Dane literaturowe jednoznacznie wskazują także na negatywny wpływ palenia papierosów na przebieg ChLC, zwłaszcza w odniesieniu do postaci przetokowej i zmian zlokalizowanych w obrębie jelita cienkiego [4,11-14]. Duże, choć nadal słabo zbadane znaczenie, wydają się mieć czynniki dietetyczne, rozumiane jako tzw. „zachodni” styl żywienia. Obejmuje on m.in. spożywanie produktów wysoko przetworzonych, bogatych w tłuszcze nasycone, o wysokim indeksie glikemicznym [4,11-14]. O roli żywienia w patogenezie ChLC już od pierwszych dni życia świadczyć może chociażby fakt ochronnego wpływu karmienia piersią na rozwój ChLC w przyszłości [4,11-14].

1.1.4 Objawy ChLC i przebieg kliniczny

ChLC jest chorobą przewlekłą, przebiegającą z okresami remisji oraz zaostrzeń. Pierwsze objawy chorobowe mogą być dość niespecyficzne. Większość pacjentów skarży się na bóle brzucha, utratę masy ciała, ogólne pogorszenie samopoczucia. U części chorych można zaobserwować zwiększenie liczby wypróżnień, zmianę konsystencji stolców oraz sporadycznie pojawiające się domieszki świeżej krwi w stolcu [1,4,12]. Oprócz typowych objawów gastroenterologicznych, w przebiegu ChLC może wystąpić szereg manifestacji pozajelitowych, jak np. zapalenie/bóle stawów, zmiany skórne (rumień guzowaty, piodermia zgorzelinowa) czy zapalenie spojówek [26, 27]. Choroba może skrycie rozwijać się przez lata, ale bywa też tak, że już pierwszy rzut jest bardzo ciężki i pacjenci z podejrzeniem tzw. „ostrego brzucha” wymagają leczenia chirurgicznego. W części przypadków pierwszą manifestacją ChLC są zmiany okołodbytowe w postaci ropni i przetok [4].

Charakterystyka symptomatologiczna ChLC w dużej mierze zależy od lokalizacji i fenotypu zmian zapalnych. U pacjentów z obecnością zmian chorobowych w obrębie jelita cienkiego (przede wszystkim – jelita krętego) dominującymi objawami są bóle brzucha,

rzutujące się głównie w prawym dole biodrowym oraz śródbrzuszu. W tej postaci choroby dochodzić może do zwężeń przewodu pokarmowego, które są powodem szczególnie nasilonych dolegliwości bólowych, związanych z utrudnionym pasażem jelitowym, a w skrajnych przypadkach może rozwijać się pełna niedrożność [1,4,12]. Natomiast jeśli zmiany chorobowe zlokalizowane są wyłącznie w obrębie jelita grubego (ok. 20% pacjentów), dominuje biegunka z ewentualną domieszką świeżej krwi w stolcu. W dużej grupie chorych, bo u ok. 40-50%, proces zapalny obecny jest zarówno w jelicie cienkim jak i grubym. W takich przypadkach symptomatologia ChLC jest złożona i obejmuje głównie współwystępowanie biegunki i bólów brzucha. Sporadycznie ChLC może dotyczyć także górnego odcinka przewodu pokarmowego. Jeśli proces chorobowy toczy się w przełyku lub żołądka, głównymi dolegliwościami zgłaszanymi przez pacjentów są nudności, wymioty, bóle nadbrzusza oraz dysfagia, a także pogorszenie apetytu i spadek masy ciała [4,12].

Zarówno lokalizacja zmian chorobowych, jak i ich fenotyp, zostały uwzględnione w tzw. klasyfikacji montrealskiej ChLC, stworzonej w 2005 roku [11]. Trzecim elementem, który obejmuje ta najpowszechniej używana dla zdefiniowania postaci klinicznej ChLC klasyfikacja, jest wiek pacjenta w momencie zachorowania (Tabela 1).

Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska choroby Leśniowskiego-Crohna [4,11].

Parametr	Klasyfikacja montrealaska
Wiek w momencie postawienia diagnozy (Age)	A1 \leq 16 roku życia A2 17-40 rok życia A3 \geq 40 roku życia
Lokalizacja (Location)	L1 końcowy odcinek jelita krętego L2 okrężnica L3 końcowy odcinek jelita krętego i okrężnica L4 górny odcinek przewodu pokarmowego
Przebieg kliniczny/fenotyp (Behavior)	B1 postać zapalna B2 postać zwężająca B3 postać przetokowa (drażąca) p zmiany okołodbytowe

1.2 Diagnostyka i ocena aktywności ChLC

Od momentu pojawienia się objawów do postawienia ostatecznego rozpoznania ChLC często mija kilka miesięcy, a niekiedy lat. Według ostatnich danych literaturowych odstęp ten wynosi nawet około 5 lat [28]. Diagnostyka NChZJ jest procesem złożonym i obejmuje, oprócz oceny klinicznej, szereg badań dodatkowych, a wśród nich badania laboratoryjne, obrazowe, endoskopowe oraz histopatologiczne.

Spośród badań laboratoryjnych kluczowe znaczenie ma oznaczenie morfologii krwi obwodowej oraz parametrów odzwierciedlających nasilenie stanu zapalnego, do których zalicza się m.in. białko C-reaktywne (*ang.* C-reactive protein – CRP), odczyn Biernackiego (OB) czy fibrynogen [28-31]. Niestety badania te wskazują głównie na toczący się ogólnoustrojowy proces zapalny, a więc jedynie pośrednio świadczą o zaawansowaniu procesu chorobowego w przewodzie pokarmowym. Co więcej, w ChLC zdarza się, że w ograniczonej postaci choroby (np. w lokalizacji krętniczo-kątniczej) nawet przy aktywnych zmianach zapalnych, wykładniki te mogą pozostawać nieadekwatnie niskie [30]. Z kolei leukocytoza, mogąca także świadczyć o nasileniu zapalenia, może wynikać z prowadzonej terapii, gdyż liczba białych krwinek wzrasta w czasie leczenia glikokortykosteroidami. W trakcie diagnostyki ChLC warto wykonać również oznaczenie parametrów gospodarki żelazem, w tym m.in. stężenia jonów żelaza, ferrytyny, całkowitej i utajonej zdolności wiązania żelaza (*ang.* total iron binding capacity – TIBC; *ang.* unsaturated IBC – UIBC), gdyż w tej grupie chorych często stwierdza się niedokrwistość z niedoboru żelaza.

Duże znaczenie w diagnostyce NChZJ odgrywają badania obrazowe. Nawet najmniej inwazyjne i powszechnie dostępne badanie ultrasonograficzne (USG) jamy brzusznej może wiele wnieść w proces diagnostyczny, gdyż już w tak prostym badaniu doświadczony radiolog może opisać pogrubiałe odcinkowo ściany jelit, zwłaszcza jeśli lokalizują się one w okolicy *ileum terminale* [11,12,28,31-34]. Poszerzenie standardowego USG o technikę elastografii pozwala na dokładniejszą ocenę aktywności nacieku zapalnego. Duże znaczenie ma również wykorzystanie ultrasonografii przezodbytniczej (*ang.* transrectal ultrasonography - TRUS). Ocena okolicy odbytu oraz odbytnicy metodą TRUS pozwala na

diagnostykę obecności ewentualnych ropni oraz przetok okołodbytowych lub dopochwowych w małoinwazyjny i powtarzalny sposób [31-34]. Jednak w wybranych przypadkach wymagana jest bardziej szczegółowa ocena narządów jamy brzusznej i miednicy. W tym celu szeroko stosowanymi metodami są badania tomografii komputerowej (*ang.* computed tomography - CT) oraz rezonansu magnetycznego (*ang.* magnetic resonance - MR) jamy brzusznej i miednicy [11,12,28,31-34]. W badaniach tych można określić lokalizację zmian zapalnych oraz obecność ewentualnych guzów zapalnych lub ropni. Znacznie większą czułość i specyficzność w tym zakresie wykazuje badanie MR. Dodatkowym atutem tej metody jest większe bezpieczeństwo dla pacjenta i brak narażenia na promieniowanie rentgenowskie. Pewną modyfikacją techniki CT i MR, umożliwiającą szczegółową ocenę ściany przewodu pokarmowego, jest enterokliza [28,30,33]. Badanie to polega na wypełnieniu światła jelita środkiem kontrastowym podawanym przez zgłąbnik wprowadzony do jelita cienkiego za więzadło Treitza. Niewątpliwie mankamentem tej metody jest konieczność zakładania zgłąbnika DOJELITOWEGO i sposób podawania środka kontrastowego, co bywa źle tolerowane przez pacjentów. Również w tej technice więcej atutów przemawia za badaniem wykonanym w opcji MR, a dodatkową przewagą MR jest większa czułość w uwidacznianiu zmian włóknistych powstających w przebiegu ChLC. Przełomem w diagnostyce zmian w obrębie jelita cienkiego okazała się enterografia rezonansu magnetycznego (*ang.* magnetic resonance enterography - MRE) [28,30,33]. Badanie to posiada podobną przydatność diagnostyczną do enteroklizy, ale sama procedura jest mniej inwazyjna i bardziej akceptowana przez chorych. Pacjent w przeddzień badania dokonuje oczyszczenia przewodu pokarmowego odpowiednimi środkami przeczyszczającymi. Następnie w dniu badania wypija określoną ilość płynu zawierającego kontrast - zalecane są środki negatywnie kontrastujące, którego przedstawicielem jest m.in. roztwór mannitolu. Z reguły samodzielne przyjmowanie środka kontrastowego jest dobrze tolerowane i pacjenci preferują taką drogę podania w porównaniu do podawania środka kontrastowego przez zgłąbnik, jak ma to miejsce w badaniu enteroklizy. W ramach badania MRE, oprócz środka podawanego doustnie, drogą dożylną zostaje podany także kontrast wykorzystywany w badaniu MR, który oparty jest na związkach gadoliny. U tak przygotowanego pacjenta w trakcie MRE radiolog może ocenić zarówno grubość ścian jelit, grubość określonej warstwy jelita, światło jelit, obecność ewentualnego nacieku okolicznej tkanki tłuszczowej, odczyn węzłowy. Metoda ta także uwidacznia istnienie

ewentualnych przetok oraz ropni w obrębie przewodu pokarmowego, a także ułatwia różnicowanie aktywnych zmian zapalnych od przewlekłych zmian o charakterze włóknienia [34]. Ograniczeniem tej metody jest mimo wszystko dość uciążliwe przygotowanie, koszty oraz ograniczona dostępność do pracowni wykonujących MRE.

Mimo rozwoju nieinwazyjnych metod diagnostycznych NChZJ, jak omówiona powyżej MRE, tzw. „złotym standardem” diagnostycznym w ChLC nadal pozostaje ileokolonoskopia z pobraniem licznych wycinków do badania histopatologicznego [11,12,28,30,32,34]. Endoskopowe badania przewodu pokarmowego jak na razie są niezbędne do jednoznacznego postawienia diagnozy. Pacjent, u którego podejrzewamy ChLC powinien mieć endoskopowo oceniony zarówno dolny, jak i górny odcinek przewodu pokarmowego, ze względu na możliwą lokalizację zmian zapalnych na całej długości przewodu pokarmowego. Ileokolonoskopia jest także najbardziej wiarygodnym sposobem oceny skuteczności leczenia, ponieważ umożliwia uwidocznienie zjawiska tzw. gojenia śluzówkowego (*ang.* mucosal healing – MH), które ma duże znaczenie prognostyczne w ChLC [28,30,34]. W trakcie endoskopii należy także pobrać wycinki do badania histopatologicznego. Pełnej oceny zmian charakterystycznych dla ChLC można jednak dokonać jedynie dysponując preparatem chirurgicznym. Na typowy obraz histopatologiczny w aktywnej postaci ChLC składa się nieswoisty naciek zapalny, obejmujący całą grubość ściany jelitowej. Charakterystyczna jest nieciągłość zmian chorobowych oraz występowanie głębokich owrzodzeń. Typową manifestacją histopatologiczną dla ChLC są ziarniniaki nieserowaciejące z obecnością komórek nabłonkowatych oraz olbrzymich Langhansa. Obecny może być także zanik kosmków jelitowych, przerost grudek chłonnych oraz włóknienie [35].

Przedstawione powyżej badania dodatkowe są uzupełnieniem oceny klinicznej, która zawsze odgrywa pierwszoplanową rolę. Należy też podkreślić, że nie ma jednej techniki diagnostycznej, która pozwala jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć ChLC [11,28,33]. Od lat czynione są także starania, aby metody te służyły także do maksymalnie obiektywnej oceny aktywności już zdiagnozowanej ChLC. W tym celu konstruowane są rozliczne skale i systemy punktacyjne. W odniesieniu do aktywności klinicznej jedną z najpowszechniej używanych skal jest stworzona w latach 70-tych XX wieku *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) [36,37]. Obejmuje ona ocenę punktową 8 zmiennych,

takich jak ból brzucha, samopoczucie, liczba luźnych wypróżnień w ciągu 7 ostatnich dni oraz występowanie dodatkowych objawów, do których zaliczamy obecność przetok, zmian skórnych czy stanów gorączkowych. Poza tym w skali tej uwzględniona jest także wartość hematokrytu, nasilenie niedoboru masy ciała, obecność guza zapalnego w jamie brzusznej w badaniu przedmiotowym oraz uwzględniany jest ewentualny fakt zażywania środków zapierających (Tabela 2). Dla populacji dziecięcej stosuje się pediatryczną skalę CDAI w modyfikacji Ryżki (*ang.* pediatric CDAI - PCDAI) [38,39].

Tabela 2. Indeks oceny aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna - Crohn's Disease Activity Index (CDAI) [36,37].

Oceniany parametr	Punktacja	Mnożnik
Liczba luźnych wypróżnień – suma z siedmiu ostatnich dni	1 luźny stolec = 1 pkt	x 2
Ból brzucha – suma z siedmiu ostatnich dni	Brak – 0 pkt Lekki – 1pkt Umiarkowany – 2 pkt Silny – 3 pkt	x 5
Ogólne samopoczucie – suma z siedmiu ostatnich dni	Dobre – 0 pkt Niecoby obniżone – 1 pkt Obniżone – 2 pkt Znacznie obniżone – 3 pkt Złe – 3 pkt	x 7
Powikłania z poza przewodu pokarmowego	Zapalenie/ból stawów – 1 pkt Zapalenie błony naczyniowej oka – 1 pkt Rumień guzowaty – 1 pkt Zgorzelińowe zapalenie skóry – 1 pkt Aftowate zapalenie jamy ustnej – 1 pkt Szczelina, ropień lub przetoka okołodbytowa- 1 pkt Inna przetoka - 1 pkt Temperatura ciała > 37,8 °C – 1 pkt	x 20
Konieczność stosowania leków zapięających	Nie- 0 pkt Tak – 1 pkt	x 30
Wyczuwalny guz w jamie brzusznej	Nie- 0 pkt Wątpliwe - 2 pkt Pewne- 3 pkt	x 10
Różnica między hematokrytem badanym, a należnym	Kobiety : 42 – hematokryt badany Mężczyźni: 47 – hematokryt badany	x 6
Stosunek masy ciała badanej do należnej w zależności od płci i wzrostu	[1 – masa ciała badana/masa ciała należna] x 100	x 1

W zależności od sumy punktów skala określa aktywność ChLC. Za remisję przyjmuje się wartość poniżej 150 punktów. Suma punktów między 150 a 219 wg skali CDAI

świadczy o małej aktywności choroby. Natomiast wartość między 220 - 450 świadczy o średniej aktywności ChLC. Na dużą aktywność choroby wskazuje wartość punktowa powyżej 450 [37]. Skala ta, choć jest relatywnie łatwa do zastosowania, nie jest narzędziem idealnym, gdyż część parametrów, jak ocena nasilenia bólów brzucha czy samopoczucia chorego jest bardzo subiektywna i zależna od badanego. Przydatność CDAI jest także ograniczona np. u pacjentów z wylonioną stomią, gdyż nie można wtedy poddać ocenie liczby luźnych stolców oddawanych przez pacjenta. Podobne wady napotykamy w zastosowaniu nieco mniej popularnej w Polsce skali Harveya-Bradshawa (Tabela 3) [40]. Skala ta jest nieco prostsza w zastosowaniu niż CDAI m.in. poprzez skrócenie okresu obserwacji objawów do dnia poprzedzającego wizytę u lekarza. W skali tej ocenie zostaje poddanych 5 parametrów: samopoczucie, liczba luźnych stolców, bóle brzucha, obecność badalnego guza w jamie brzusznej oraz obecność objawów pozajelitowych.

Tabela 3. Skala Harveya-Bradshawa oceny aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna [40].

Zmienna	Punktacja	Suma
Ogólne samopoczucie	Bardzo dobre – 0 pkt Trochę poniżej normy – 1 pkt Słabe – 2 pkt Bardzo słabe – 3 pkt Bardzo złe – 4 pkt	
Ból w jamie brzusznej	Brak- 0 pkt Łagodny – 1 pkt Umiarkowany – 2 pkt Silny – 3 pkt	
Liczba płynnych stolców na dzień	Ilość wypróżnień x 1 pkt	
Wyczuwalny opór w jamie brzusznej	Brak - 0 pkt Wątpliwy – 1 pkt Bezsprzeczny – 2 pkt Bezsprzeczny z bólem przy dotyku – 3 pkt	
Powikłania	Artralgia Zapalenie tęczówki i zapalenie błony naczyniowej oka Rumień guzowaty Afty Piodermia zgorzelinowa Szczelina odbytu Nowa przetoka Ropień - 1 pkt za każde powikłanie	
Wynik		

Także w odniesieniu do badania MRE, podejmowane są próby kwantyfikacji oceny aktywności ChLC. Najbardziej popularnym i najlepiej zwalidowanym indeksem jest skala MaRIA (*ang.* Magnetic Resonance Index of Activity), w której uwzględnia się ocenę składowych, takich jak m.in. obecność obrzęku, owrzodzeń, pogrubienie ściany jelita oraz wzmocnienie kontrastowe [41,42]. Aby jednak obliczyć ostateczną wartość, wskazującą na aktywność ChLC, należy posłużyć się dość skomplikowaną formułą matematyczną. Ponadto autorzy skali zalecają, żeby pełna ocena obejmowała także jelito grube, co wiąże się z koniecznością modyfikacji protokołu MRE, która obejmuje wprowadzenie cewnika do odbytnicy z dodatkowym podaniem środka kontrastowego. To powoduje, że MRE przestaje być procedurą całkowicie nieinwazyjną. Stąd zasadne jest poszukiwanie prostszych metod kwantyfikujących aktywność ChLC w MRE. Taką próbą jest stworzona w ramach współpracy Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych oraz Katedry Radiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu skala SEAS-CD (*ang.* Simple Enterographic Activity Score for Crohn's Disease). SEAS-CD uwzględnia ocenę 9 zmiennych, jakimi są pogrubienie ściany jelita, wzmocnienie pokontrastowe, obrzęk okołojelitowej tkanki tłuszczowej, proliferacja naczyń w strukturach okołojelitowych, limfadenopatia krezkowa, obecność owrzodzeń w ścianie jelita, obecność zwężeń, przetok wewnętrznych oraz rozległość zmian zapalnych (Tabela 4) [43]. Oceny aktywności dokonuje się osobno dla jelita czczego obliczając tzw. *jejunal* SEAS-CD oraz dla jelita krętego – *ileal* SEAS-CD. Całkowita wartość SEAS-CD jest sumą wyżej wymienionych dwóch składowych. Tak rozbudowana, ale jednocześnie prosta w zastosowaniu skala, pozwala na dokładną analizę aktywności choroby w obrębie jelita cienkiego, z uwzględnieniem różnych aspektów nasilenia procesu zapalnego. Autorzy skali wykazali, że koreluje ona w sposób bardzo istotny ze „złotym standardem” diagnostycznym, czyli ileokolonoskopią oraz ze wspomnianą skalą MaRIA [43].

Tabela 4. Prosta enterograficzna skala oceny aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna - Simple Enterographic Activity Score of Crohns Disease (SEAS-CD) [43].

Oceniana cecha w MRE	Nasilenie ocenianej cechy		
Pogrubienie ściany jelita	< 3 mm: 0 pkt	3 – 7 mm: 1 pkt	> 7 mm: 2 pkt
Wzmocnienie pokontrastowe	Brak: 0 pkt	Jednorodny character wzmocnienia: 1 pkt	Wzmocnienie warstwowe ściany jelita: 2 pkt
Obrzęk okołojelitowej tkanki tłuszczowej	Brak: 0 pkt	Obecne: 1 pkt	
Prolifercja naczyń w strukturach okołojelitowych	Brak: 0 pkt	< 5 naczyń/3 cm ² tkanki tłuszczowej okołojelitowej: 1 pkt	≥ 5 naczyń/3 cm ² tkanki tłuszczowej okołojelitowej: 2 pkt
Powiekszenie węzłów chłonnych krezkowych	Brak: 0 pkt	< 10 powiększonych (średnica > 5 mm) węzłów chłonnych: 1 pkt	≥ 10 powiększonych (średnica > 5 mm) węzłów chłonnych: 2 pkt
Obecność owrzodzeń w ścianie jelita	Brak: 0 pkt	Co najmniej 1 owrzodzenie nie przekraczające ½ grubości ściany jelita: 1 pkt	Co najmniej 1 owrzodzenie przekraczające ½ grubości ściany jelita: 2 pkt
Obecność zwężeń	Brak: 0 pkt	Zwężenie bez prestenotycznego poszerzenia jelita: 1 pkt	Co najmniej 1 zwężenie z prestenotycznym poszerzeniem jelita: 2 pkt
Przetoki wewnętrzzbrzuszne	Brak: 0 pkt	Przynajmniej jedna przetoka obecna: 5 pkt	
Rozległość zmian zapalnych (sumaryczna długość)	<30 mm: 1 pkt	30-1500 mm: 2 pkt	>1500 mm: 3 pkt

Istnieje również szereg skal, które mają obiektywizować ocenę aktywności ChLC w badaniu endoskopowym. Przykładem może być indeks CDEIS (*ang.* Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity), którego zastosowanie jest jednak czasochłonne i trudne [44-46]. Dlatego też nieco częściej w codziennej praktyce klinicznej endoskopiści korzystają ze skali *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD), w której ocenia się wielkość i rozległość owrzodzeń, powierzchnię zmian chorobowych oraz obecność zwężeń (Tabela 5) [47].

Tabela 5. Prosty indeks oceny aktywności endoskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna – Simple Endoscopic Score for Crohn's Diseases (SES-CD). Całkowita punktacja w tej skali jest sumą punktów, ocenianych osobno w 5 segmentach jelita: odbytnicy, esicy i okrężnicy zstępującej, okrężnicy poprzecznej, okrężnicy wstępującej i kątnicy oraz jelicie krętym [47].

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

1.3 Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna

ChLC jest chorobą przewlekłą o zmiennym przebiegu klinicznym z okresami remisji i zaostrzeń. Sposób i strategia leczenia zależą więc od stanu pacjenta, aktywności choroby, obecności ewentualnych objawów pozajelitowych oraz powikłań. Leczenie ChLC obejmuje zarówno postępowanie zachowawcze, jak i operacyjne. Do niedawna za jedną z podstawowych grup leków, stosowanych zarówno w indukcji, jak i podtrzymaniu remisji, uważano preparaty kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA, np. mesalazyna). Aktualnie uważa się, że skuteczność mesalazyny jest mała i w wielu wytycznych, w tym w zaleceniach *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO), leki te całkowicie zniknęły z algorytmów terapeutycznych w ChLC [31,32]. W okresach zaostrzeń większość pacjentów wymaga natomiast zastosowania glikokortykosteroidów (GKS). Leki z tej grupy można podawać drogą doustną, dożylną, jak i w postaci wlewek lub pianek doodbytniczych. Okres steroidoterapii powinien być skrócony do minimalnie wymaganego i skutecznego, gdyż leczenie GKS może wiązać się z rozwojem szeregu działań niepożądanych [31,48,49]. Podstawowymi farmaceutykami, stosowanymi w podtrzymaniu remisji ChLC, są natomiast leki immunosupresyjne. Przykładem są tiopuryny (azatiopryna, 6-merkaptopuryna), metotreksat oraz mykofenolan mofetylu [31,50-53]. Terapia immunomodulująca może być prowadzona przewlekle, lecz posiada też liczne ograniczenia. U części pacjentów obserwuje się nietolerancję tych leków oraz ich działania niepożądane jak np. leukopenia czy ostre zapalenia trzustki w przypadku tiopuryn. Okresowo w terapii ChLC stosuje się także chemioterapeutyki z grupy chinolonów, a zwłaszcza ciprofloksacynę oraz pochodne imidazolu, czyli metronidazol [31,53]. Preparaty te znajdują zastosowanie głównie u chorych z powikłaniami okołodbytowymi ChLC. Leczeniem o udowodnionej skuteczności jest także żywienie dojelitowe. Metoda ta sprawdza się głównie w populacji pediatrycznej, ze względu na lepszą tolerancję tego rodzaju terapii i pod względem skuteczności jest porównywalna ze stosowaniem GKS w indukcji remisji ChLC [31,32,53].

Obecnie za główny cel leczenia ChLC uważa się wygojenie śluzówki (MH) [31,54,55]. Cel ten można w największej mierze osiągnąć stosując leki biologiczne oraz biopodobne. Leki biologiczne wykorzystywane w leczeniu ChLC są monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko określonym molekułom, odgrywającym kluczową rolę w

kaskadzie procesu zapalnego [56]. Najbardziej sprawdzonymi i pozostającym od kilkunastu lat w szerokim użyciu są przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko jednej z głównych cytokin prozapalnych, jaką jest TNF- α . Jak do tej pory w leczeniu ChLC zarejestrowano trzy tego typu przeciwciała: infliksymab, adalimumab oraz certolizumab-pegol [56]. Nowym lekiem biologicznym, który zyskał rejestrację w leczeniu NChZJ jest vedolizumab. Lek ten jest przeciwciałem skierowanym przeciwko integrynie $\alpha_4\beta_7$. Lek, wiążąc się ze wskazaną integryną, blokuje jej reakcję ze śródbłonkowym receptorem MAdCAM-1 (*ang.* mucosal addressin cell-adhesion molecule-1), co skutkuje selektywnym hamowaniem migracji leukocytów z przedziału wewnątrznaczyniowego do tkanek jelita, przez co zmniejszony jest napływ komórek immunokompetentnych [57]. W ostatnim czasie zarejestrowano również ustekinumab do leczenia ChLC. Przeciwciało to wiąże podjednostkę p40 interleukiny-12 (IL-12) oraz interleukiny-23 (IL-23) [58].

Leczenie chirurgiczne u pacjentów z ChLC obejmuje głównie odcinkowe, maksymalnie oszczędzające resekcje jelita w przypadku zaawansowanego procesu chorobowego, prowadzącego do klinicznie jawnych zaburzeń pasażu jelitowego. Innym wskazaniem do interwencji chirurgicznej są ropnie wewnątrzbrzuszne czy perforacja przewodu pokarmowego. W przypadku występowania zmian okołodbytowych znaczna część chorych także wymaga leczenia zabiegowego. Obejmuje ono m.in. nacięcie i drenaż ropni, nacięcie lub wycięcie kanału przetok [32].

Leczenie ChLC jest procesem przewlekłym i trudnym. Aktualnie dąży się do indywidualizacji terapii u każdego chorego z uwzględnieniem poszczególnych czynników ryzyka niekorzystnego przebiegu schorzenia [31,59]. Pacjent wymaga stałego nadzoru, aby we właściwym momencie podjąć odpowiednie decyzje terapeutyczne i nie dopuścić do zaostrzenia lub - jeśli ono nastąpiło - aby ograniczyć aktywność choroby i nie doprowadzić do rozwoju powikłań.

1.4 Charakterystyka kopromarkerów ze szczególnym uwzględnieniem laktoferyny

Od lat 90-tych prowadzone są intensywne badania nad przydatnością w diagnostyce chorób przewodu pokarmowego markerów izolowanych ze stolca. Badaną grupę stanowią liczne heterogenne białka określane mianem kopromarkerów [60,61]. Są to przede wszystkim wybrane białka osocza oraz białka pochodzenia neutrofilowego. Przedstawicielem pierwszej grupy są α -1-antytrypsyna oraz α -2-makroglobulina. Do zwiększenia ich stężenia w stolcu dochodzi w wyniku zaburzenia szczelności bariery śluzówkowej i przesączania się składników osocza do światła jelita, np. w stanach zapalnych [60]. Szczególnie dużą nadzieję w wykorzystaniu w diagnostyce NChZJ pokłada się natomiast w oznaczaniu białek neutrofilowych w stolcu. Uwalniane są one z granulocytarnych ziarnistości azurochłonnych lub swoistych w miejscu toczącego się zapalenia. Przedstawicielami tej grupy są takie kopromarkery jak kalprotektyna (*ang.* fecal calprotectin - FC), mieloperoksydaza (MPO), czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α) oraz laktoferyna (*ang.* fecal lactoferrin - FL) [60-62]. Podstawową cechą kopromarkerów jest ich oporność na hydrolizę enzymatyczną, dzięki czemu przechodzą przez przewód pokarmowy nie ulegając strawieniu. Najlepiej poznanym kopromarkerem w diagnostyce chorób przewodu pokarmowego jest jak do tej pory FC [63-65]. FC jest białkiem neutrofilowym należącym do rodziny białek S100 z grupy kalgranulin. Białko to stanowi ok. 30-60% białek cytozolowych neutrofilów oraz, w mniejszym stopniu, monocytów i makrofagów. Posiada zdolności wiązania wapnia i cynku, co przekłada się na jej właściwości bakteriostatyczne [63]. Z danych literaturowych wynika, że oznaczenia stężenia tego białka w stolcu charakteryzuje się wysoką czułością oraz swoistością w różnicowaniu zaburzeń czynnościowych (głównie zespołu jelita drażliwego) z NChZJ [64-66]. W ostatnich latach opublikowano także szereg prac wskazujących na bardzo dobrą korelację stężenia FC z aktywnością zmian endoskopowych w NChZJ [67-70]. Dodatkowo dysponujemy dowodami, że podwyższone stężenie FC jest czynnikiem prognostycznym wczesnego nawrotu zmian chorobowych u osób po przebyciu zabiegu operacyjnym w przebiegu ChLC, a także może zapowiadać zaostrzenie choroby u pacjentów pozostających w farmakologicznie wyindukowanej remisji [71-73]. W związku z powyższym, oznaczanie FC stało się już niemalże rutynowym badaniem w grupie

pacjentów z rozpoznaną chorobą z kręgu NChZJ, a także w przypadku diagnostyki różnicowej czynnościowych i organicznych przyczyn biegunki. Warto w tym miejscu jednak zaznaczyć, że obecność tego białka w stolcu nie jest typowa tylko dla zaostrzenia NChZJ, gdyż podwyższone stężenie FC obserwuje się także w chorobach infekcyjnych przewodu pokarmowego (zwłaszcza - o etiologii bakteryjnej) czy np. w nowotworach jelita (głównie w raku jelita grubego). Dlatego uważa się, że w przypadku pacjentów do tej pory niediagnostowanych, u których nie są znane przyczyny stwierdzanych dolegliwości, ocena FC powinna być zawsze rozpatrywana w kontekście obrazu klinicznego i odchyień w innych badaniach dodatkowych.

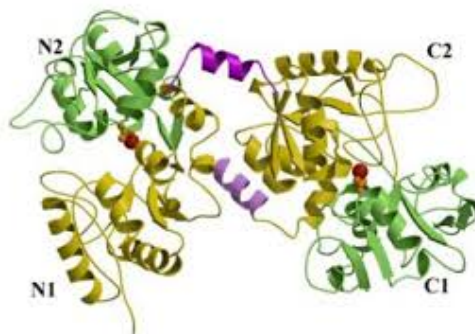
Kolejnym z badanych kopromarkerów jest MPO, będąca enzymem z grupy peroksydaz o masie cząsteczkowej ok. 140 kDa, posiadającym silne właściwości bakteriobójcze i przeciwwirusowe [74]. Dane na temat wykorzystania MPO w diagnostyce NChZJ są jednak znacznie bardziej ograniczone, w porównaniu do FC. Jeszcze mniej wiadomo na temat potencjalnych korzyści z oceny obecności TNF- α w kale. Z patofizjologicznego punktu widzenia oznaczanie tej molekuly w stolcu w NChZJ byłoby niezwykle ciekawe, jednak z nielicznych badań, które ukazały się do tej pory wynika, że zbyt mała stabilność fizykochemiczna tej glikoproteiny ogranicza jej praktyczne wykorzystanie.

1.4.1 Charakterystyka laktoferyny

Laktoferyna jest kolejnym potencjalnym kopromarkerem, którego zastosowanie w diagnostyce NChZJ budzi duże nadzieje. Pierwsze doniesienia na temat tego białka pojawiły się w latach 30-tych XX wieku, kiedy to w 1939 roku z mleka krowiego wyizolowano związek, który nazwano nieznaną „czerwoną frakcją” [75]. Odkrycia tego dokonali duńscy naukowcy M. i S. Soerensen. Nowo wyizolowane białko charakteryzowało się intensywnie czerwonym kolorem podczas inkubacji w obecności jonów żelaza, niewiele jednak wiedziano o jego znaczeniu i funkcji [75]. Kolejne doniesienia opisujące laktoferynę pojawiły się w 1960 roku, kiedy to w mleku ludzkim opisano proteinę o silnych właściwościach wiążących żelazo i budowie zbliżonej do transferyny [76-78]. Białko to nazwano laktotransferyną, gdyż upatrywano w nim homologicznego do transferyny nośnika jonów żelazowych. Jak się później okazało, odkrytym związkiem była laktoferyna, która oprócz zdolności wiązania żelaza jest multipotencjalnym białkiem o wielokierunkowych profilach działania.

Laktoferyna należy do białek serwatkowych mleka. Wyizolowano ją z mleka różnych gatunków ssaków. Jej stężenie w mleku jest zmienne - największe występuje w sianie i wynosi ok. 6-8 g/L w porównaniu do 2-4 g/L w mleku dojrzałym [79]. Laktoferyna jest wydzielana poprzez komórki nabłonka wydzielniczego i w mniejszym stężeniu niż w mleku wchodzi także w skład wielu płynów ustrojowych, jak np. ślina, łzy, płyn mózgowo-rdzeniowy, wydzielina dróg oddechowych oraz płyn nasienny [80]. Jest ona także obecna w ziarnistościach granulocytów, z których podczas degranulacji uwalniana jest w miejscach toczącego się procesu zapalnego [81].

Ludzka laktoferyna jest glikoproteiną zbudowaną z 703 reszt aminokwasowych i należy do białek z grupy transferyn. Masa cząsteczkowa wynosi ok. 80 kDa. Budowę trzeciorzędową laktoferyny określono w 1984 roku za pomocą krystalografii rentgenowskiej [82]. Przestrzennie białko to zbudowane jest z 2 kulistych homologicznych płatów, które nazwano płatem N i C (Ryc. 2). Płaty zbliżone są do siebie budową, każdy ma masę ok. 40 kDa. Płat N zbudowany jest z reszt aminokwasowych 1-333, natomiast płat C - z reszt 345-691. Płaty połączone są spiralnym mostkiem, który tworzą reszty aminokwasowe 334-344. Dodatkowo każdy z płatów składa się z 2 domen α i β . Domeny te nazwano odpowiednio domenami N1 i N2 oraz C1 i C2. Laktoferyna w zależności od miejsca pochodzenia w organizmie człowieka, charakteryzuje się odmiennym profilem glikozylacji cząsteczki. Białko pochodzenia nabłonkowego, którego przykładem jest laktoferyna wchodząca w skład mleka, odznacza się dużym odsetkiem reszt cukrowych N-acetyloglukozaminowych, a także zawierających mannozę, galaktozę, kwas sialowy oraz fukozę [81-83]. Natomiast w przypadku laktoferyny, której źródłem są granulocyty, w istotnie mniejszym stopniu stwierdza się obecność reszt fukozowych. Jest to o tyle ważne, że to właśnie w dużej mierze od glikozylacji i obecności określonych reszt cukrowych zależą specyficzne właściwości laktoferyny i jej powinowactwo do określonych receptorów [84].



Rycina 2. Budowa przestrzenna laktoferyny [J.Artytm, „Laktoferyna-niezwykłe białko”, Warszawa 2016, Wydawnictwo Borgis: 23].

Jedną z zasadniczych właściwości cząsteczki laktoferyny jest zdolność wiązania jonów żelaza (Fe) [80-84]. Na jedną cząsteczkę białka przypadają dwa jony Fe. Wiązanie jonu żelaza z laktoferyną jest mocne i stabilne, ale odwracalne, a siła wiązania jest większa dla jonu Fe^{3+} niż dla jonu Fe^{2+} . Przyłączenie Fe do cząsteczki białka zmienia jego strukturę przestrzenną i zmniejsza podatność na degradację. Holo-laktoferyna, czyli laktoferyna związana z Fe, ma strukturę bardziej zamkniętą w porównaniu do apo-laktoferyny, czyli postaci białka bez przyłączonych jonów Fe. Zazwyczaj jedynie ok. 10-30% natywnej formy laktoferyny jest wysycone Fe. Co ciekawe, cząsteczka tego białka może przyłączać również inne jony, jak np. kationy miedzi, manganu, kobaltu, magnezu, cynku oraz wapnia [80-84].

Jak wspomniano powyżej, laktoferyna pełni szereg różnorodnych funkcji. Jedną z podstawowych jej cech są właściwości przeciwdrobnoustrojowe [80,81,85]. W wielu badaniach udowodniono bowiem działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze oraz przeciw pasożytnicze laktoferyny. Jest ona aktywna zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Działanie przeciwbakteryjne polega m.in. na sekwestracji Fe, bezpośrednim niszczeniu bakterii poprzez uszkodzenie ścian komórkowych, hamowaniu procesów adhezji bakterii do błon komórkowych, tworzeniu toksycznych reaktywnych form tlenu oraz promowaniu apoptozy komórek zakażonych bakteriami [79,80,81,85]. Podobne mechanizmy działania tego białka odpowiadają za jego

właściwości przeciwwirusowe. Znany jest także potencjał przeciwwirusowy laktoferyny, jednak mechanizmy za to odpowiedzialne są słabo poznane. Jak do tej pory najdokładniej potwierdzono wpływ na adsorpcję oraz wnikanie wirusów do komórki. Dane literaturowe wskazują także na hamujący wpływ laktoferyny na replikację wirusów [79,80,81,85]. Glikoproteina ta także działa przeciwpasożytniczo, zwłaszcza wobec pierwotniaków. Główną rolę w tej aktywności przypisuje się mechanizmom związanym z tworzeniem reaktywnych form tlenu oraz hamującemu wpływowi na adhezję pierwotniaków do komórki [84]. Białko to pełni także ważną rolę dla prawidłowego rozwoju noworodka karmionego mlekiem. Bierze m.in. udział w przyswajaniu składników odżywczych z pożywienia, wpływa na rozwój oraz ochronę ściany jelit, reguluje skład mikrobioty jelitowej oraz bierze udział w rozwoju i dojrzewaniu układu odpornościowego [79,80,81,85]. Mniej poznany, ale równie interesujący wydaje się być wpływ laktoferyny na metabolizm tkanki kostnej, glukozy, lipidów, gojenie się ran. Opisywane są także jej właściwości przeciwbólowe, hipotensyjne, a nawet przeciwnowotworowe [85]. Białko to może również odgrywać ważną rolę w modyfikowaniu odpowiedzi immunologicznej. Badania doświadczalne pokazują bowiem, że laktoferyna może działać zarówno pro- jak i przeciwzapalnie. Odbywa się to najprawdopodobniej poprzez wpływ na określone szlaki odpowiedzi immunologicznej, w tym - na komórki układu odpornościowego. Szczegóły tych zjawisk nie są jednak dobrze poznane [79,80,81,85].

Laktoferyna charakteryzuje się wyjątkową stabilnością biologiczną. Nie podlega strawieniu w przewodzie pokarmowym. W warunkach pokojowych nie ulega rozpadowi przez około 7 dni, a w temperaturze do 50°C nie ulega proteolizie nawet do 48 godzin. Pozostaje stabilna także podczas procesu mrożenia i rozmrażania, więc może stanowić przydatny materiał badawczy [86-87]. Biorąc pod uwagę powyższe właściwości fizykochemiczne, a także fakt obecności tego białka w ziarnistościach granulocytów, laktoferyna oznaczana w kale wydaje się spełniać warunki bardzo dobrego parametru, który mógłby odzwierciedlać nasilenie procesu zapalnego w przewodzie pokarmowym u chorych na NChZJ. Badania w tym zakresie trwają od lat, ale wciąż nie dysponujemy wieloma dowodami, które w sposób precyzyjny wskazywałyby na miejsce FL w algorytmach diagnostycznych ChLC czy WZJG [86-93]. Większość prac, odnoszących się do roli kopromarkerów w ocenie aktywności NChZJ, dotyczy bowiem kalprotektyny. W opublikowanych ostatnio meta-analizach badań, poświęconych temu problemowi,

odnoszono się w głównej mierze do wskazania roli FL w diagnostyce różnicowej między NChZJ, a zaburzeniami czynnościowymi. Wykazano m.in., że FL charakteryzuje się 78% czułością i 94% specyficzną w różnicowaniu zespołu jelita drażliwego i NChZJ [92]. W innej meta-analizie stwierdzono, że marker ten z 92% czułością i 79% specyficzną pozwala przewidywać obecność aktywnych zmian endoskopowych u pacjentów z NChZJ [93]. Dysponujemy także pewnymi dowodami, że FL może służyć do monitorowania odpowiedzi na zastosowanie leczenia, w tym na terapię biologiczną [94-96]. Prac w tym zakresie jest jednak mało – szczególnie w odniesieniu do trudniejszej z diagnostycznego punktu widzenia choroby, jaką jest ChLC. Ponadto większość badań nie uwzględnia znacznej różnorodności przebiegu klinicznego ChLC, w tym zwłaszcza – heterogenności lokalizacji zmian chorobowych w przewodzie pokarmowym. Interesująca i ważna ze względów praktycznych byłaby zwłaszcza ocena przydatności zastosowania FL u chorych z ChLC z lokalizacją zmian zapalnych wyłącznie w zakresie jelita cienkiego. Jak dotąd jednak nie dysponujemy badaniami, które pozwoliłyby wskazać miejsce i rolę tego kopromarkera w diagnostyce ChLC w zależności od różnej lokalizacji choroby.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Mając na uwadze istotę problemu, jakim jest zwiększająca się liczba chorych z ChLC oraz trudności związane z diagnostyką i monitorowaniem aktywności tej choroby, ustalono następujące cele pracy:

- ocena przydatności FL w ocenie aktywności klinicznej ChLC, poprzez odniesienie do wartości indeksu CDAI oraz do wyników badań biochemicznych
- analiza przydatności oznaczania FL w ocenie aktywności ChLC z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie grubym, poprzez korelację z obrazem endoskopowym
- analiza przydatności oznaczania FL w ocenie aktywności ChLC z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim, poprzez korelację z nasileniem zmian chorobowych w MRE
- ocena przydatności oznaczania FL w ocenie aktywności ChLC z lokalizacją choroby zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym, poprzez korelację z wynikami kolonoskopii oraz MRE
- określenie stężenia FL przydatnego w różnicowaniu remisji od aktywnej postaci ChLC w ocenie endoskopowej

3. PACJENCI I METODY

3.1 Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 101 dorosłych pacjentów Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z potwierdzoną na podstawie obrazu klinicznego, endoskopowego, histopatologicznego ChLC. Kryterium wykluczenia z analizy stanowiła ciąża, współistnienie zmian zapalnych w górnym odcinku przewodu pokarmowego oraz obecność stomii. Do badania zostali zakwalifikowani pacjenci z przynajmniej rocznym wywiadem chorobowym od czasu postawienia diagnozy. Charakterystykę całej grupy badanej z uwzględnieniem aktywności klinicznej (CDAI – Tabela 2) i postaci ChLC (klasyfikacja montrealaska – Tabela 1) przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Charakterystyka całej grupy badanej

Liczebność grupy	101
Kobiety	44 (44%)
Mężczyźni	57 (56%)
Wiek – mediana, (25% i 75% percentyl)	30 lat (24 - 37)
Palacze	15 (15%)
Przebyta operacja brzuszna	39 (39%)
Czas trwania objawów - mediana, (25% i 75% percentyl)	6,2 lata (3 - 11)
Czas trwania choroby - mediana, (25% i 75% percentyl)	3 lata (1 - 8)
Postać choroby wg klasyfikacji montrealskiej	
A1	17 (17%)
A2	72 (71%)
A3	12 (12%)
L1	39 (38,6%)
L2	24 (23,7%)
L3	38 (37,7%)
B1	73 (72%)
B2	13 (13%)
B3	9 (9%)
P	6 (6%)
Aktywność kliniczna na podstawie skali <i>Crohn's Disease Activity Index (CDAI)</i>	
Remisja: CDAI < 150 pkt.	28 (28%)
Mała aktywność: CDAI 150-219 pkt.	28 (28%)
Średnia aktywność: CDAI 220-450 pkt.	39 (39%)
Duża aktywność: CDAI > 450 pkt.	6 (5%)
Stosowane leki	
Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego	91 (90%)
Steroidy	40 (40%)
Azatiopryna	62 (61%)
Antybiotyki	34 (33%)
Probiotyki	45 (45%)
Adalimumab	30 (29%)
Inflixymab	27 (26%)

Grupę badaną podzielono ze względu na lokalizację zmian chorobowych w obrębie przewodu pokarmowego na 3 odrębne podgrupy, a mianowicie podgrupę L1 z lokalizacją zmian w obrębie jelita cienkiego, podgrupę L2 z lokalizacją zmian w obrębie jelita grubego oraz podgrupę L3 z lokalizacją zmian zarówno w jelicie grubym i cienkim. Charakterystykę poszczególnych podgrup badanych przedstawiono w odpowiednich tabelach znajdujących się poniżej (Tabele 7-9).

Tabela 7. Charakterystyka podgrupy L1 - chorzy z izolowaną lokalizacją zmian zapalnych w jelicie cienkim

Liczebność grupy	39
Kobiety	11 (28%)
Mężczyźni	28 (72%)
Wiek - mediana, (25% i 75% percentyl)	31 lat (26 – 42)
Palacze	9 (23%)
Przebyta operacja brzuszna	18 (46%)
Czas trwania objawów - mediana, (25% i 75% percentyl)	5 lat (2 – 10)
Czas trwania choroby - mediana, (25% i 75% percentyl)	2 lata (0,6-6,75)
Postać choroby wg klasyfikacji montrealskiej	
A1	4 (10%)
A2	28 (72%)
A3	7 (18%)
B1	25 (64%)
B2	7 (18%)
B3	5 (13%)
P	2 (5%)
Aktywność kliniczna na podstawie skali <i>Crohn's Disease Activity Index</i> (CDAI)	
Remisja: CDAI < 150 pkt	13 (33%)
Mała aktywność: CDAI 150-219 pkt	13 (33%)
Średnia aktywność: CDAI 220-450 pkt	12 (31%)
Duża aktywność: CDAI > 450 pkt	1 (3%)
Stosowane leki	
Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego	32 (82%)
Steroidy	14 (36%)
Azatiopryna	20 (51%)
Antybiotyki	13 (33%)
Probiotyki	18 (46%)
Adalimumab	13 (33%)
Inflixymab	7 (18%)

Tabela 8. Charakterystyka podgrupy L2 - chorzy z izolowaną lokalizacją zmian zapalnych w jelicie grubym

Liczebność grupy	24
Kobiety	14 (58%)
Mężczyźni	10 (42%)
Wiek - mediana, (25% i 75% percentyl)	29,5 lat (23-40)
Palacze	1 (4%)
Przebyta operacja brzuszna	9 (37%)
Czas trwania objawów - mediana, (25% i 75% percentyl)	10 lat (1-14,5)
Czas trwania choroby - mediana, (25% i 75% percentyl)	3 lat (0,75-9)
Postać choroby wg klasyfikacji montrealskiej	
A1	4 (17%)
A2	17 (71%)
A3	3 (12%)
B1	17 (71%)
B2	4 (17%)
B3	0 (0%)
P	3 (12%)
Aktywność kliniczna na podstawie skali <i>Crohn's Disease Activity Index (CDAI)</i>	
Remisja: CDAI < 150 pkt	8(33%)
Mała aktywność: CDAI 150-219 pkt	6(25%)
Średnia aktywność: CDAI 220-450 pkt	8(33%)
Duża aktywność: CDAI > 450 pkt	2(9%)
Stosowane leki	
Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego	24 (100%)
Steroidy	13 (54%)
Azatiopryna	13 (54%)
Antybiotyki	11 (46%)
Probiotyki	11 (46%)
Adalimumab	7 (29%)
Inflixymab	6 (25%)

Tabela 9. Charakterystyka podgrupy L3 - chorzy z lokalizacją zmian zapalnych zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym

Liczebność grupy	38
Kobiety	19 (50%)
Mężczyźni	19 (50%)
Wiek - mediana, (25% i 75% percentyl)	28 lat (21 - 32)
Palacze	5 (13%)
Przebyta operacja	12 (31%)
Czas trwania objawów - mediana, (25% i 75% percentyl)	7 lat (5-11)
Czas trwania choroby - mediana, (25% i 75% percentyl)	5,5 lat (1-10)
Postać choroby wg klasyfikacji montrealskiej	
A1	9 (24%)
A2	27 (71%)
A3	2 (5%)
B1	31 (82%)
B2	2 (5%)
B3	4 (10%)
P	1 (3%)
Aktywność kliniczna na podstawie skali <i>Crohn's Disease Activity Index</i> (CDAI)	
Remisja: CDAI < 150 pkt	7 (18%)
Mała aktywność: CDAI 150-219 pkt	9 (25%)
Średnia aktywność: CDAI 220-450 pkt	19 (50%)
Duża aktywność: CDAI > 450 pkt	3 (7%)
Stosowane leki	
Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego	35 (92%)
Steroidy	14 (37%)
Azatiopryna	28 (74%)
Antybiotyki	10 (26%)
Probiotyki	16 (42%)
Adalimumab	10 (26%)
Inflixymab	14 (37%)

3.2 Metody

3.2.1 Ocena kliniczna

Aktywność kliniczną ChLC oceniono u wszystkich chorych posługując się skalą CDAI (Tabela 2). Za wartość oznaczającą remisję kliniczną przyjęto CDAI poniżej 150 punktów. Wartość pomiędzy 150 a 219 punktów oznaczała łagodny rzut choroby, CDAI pomiędzy 220 a 450 punktów wskazywało na średnio nasilony rzut choroby, natomiast wartość powyżej 450 punktów przyjęto za wyznacznik ciężkiego rzutu ChLC [37].

3.2.2 Badania biochemiczne

U wszystkich chorych pobrano krew na rutynowe badania laboratoryjne, służące do oceny aktywności biochemicznej ChLC. W analizie uwzględniono następujące parametry: morfologia krwi obwodowej, białko C-reaktywne (*ang.* C-reactive protein – CRP), fibrynogen, odczyn Biernackiego (OB.). Wszystkie badania wykonano w Centralnym Laboratorium Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H. Święcickiego w Poznaniu w ramach rutynowej diagnostyki.

3.2.3 Ocena stężenia laktoferyny w kale

Wszyscy pacjenci oddali do badania próbkę kału o minimalnej wadze 5 g, którą zamroźono i przechowywano w temperaturze - 20°C. Materiał przechowywano do momentu wykonywania oznaczeń, jednak nie dłużej niż 12 miesięcy. Przed wykonaniem oznaczenia próbki kału były rozmrażane w temperaturze pokojowej. Całość procedury oznaczania stężenia laktoferyny była przeprowadzana zgodnie z zaleceniami producenta zestawu detekcyjnego IBD-SCAN TechLab (nr katalogowy 30351). Z próbki kału ekstrahowano około 0,05 g materiału. Następnie materiał ten rozcieńczono poprzez dodanie 450 µl rozcieńczalnika. Dokonano kolejnych rozcieńczeń materiału, przenosząc 50 µl roztworu do kolejnych próbek zawierających 450 µl rozcieńczalnika. W próbówce nr 1 materiał był rozcieńczany rozcieńczalnikiem w stosunku 1:10. Następnie 50 µl roztworu z próbówki nr 1 przeniesiono do próbówki nr 2, gdzie rozcieńczono roztwór w stosunku 1:100. 50 µl roztworu z próbówki nr 2 przeniesiono do próbówki nr 3, gdzie roztwór rozcieńczono do stosunku 1:1000. Proces powtarzano do uzyskania rozcieńczenia

1:100000. W pracy zastosowano następujące rozcieńczenia prób: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000. 100 µl rozcieńczonego materiału наносono do studzienek reakcyjnych. Jednocześnie na płytkę наносono po 100 µl kontroli dodatniej i ujemnej oraz roztworów standardowych. Dzięki temu możliwe było wykreślenie krzywej kalibracyjnej, gdzie oś rzędnych przedstawiała znane stężenia roztworów standardowych, natomiast z osi odciętych możliwe było odczytanie, na podstawie zmierzonej absorbancji, poziomu laktoferyny w badanych próbach. Studzienki reakcyjne opłaszczono były przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko ludzkiej laktoferynie. Inkubacja prowadzona była przez 30 minut w temperaturze 37°C. W tym czasie dochodziło do związania FL obecnej w materiale biologicznym z przeciwciałami. Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano pięciokrotnie buforem płuczącym. Następnie dodawano koniugat zawierający królicze poliklonalne przeciwciała swoiste dla ludzkiej laktoferyny sprzężone z peroksydazą chrzanową i inkubowano ponownie w temperaturze 37°C przez 30 minut. W wyniku tych procedur otrzymywano kompleks złożony z unieruchomionych na ściankach studzienek reakcyjnych przeciwciał poliklonalnych przeciw ludzkiej laktoferynie, FL pochodzącej z badanego materiału lub roztworów standardowych oraz króliczych przeciwciał przeciw laktoferynie sprzężonych z peroksydazą chrzanową. W kolejnym etapie do każdej studzienki reakcyjnej dodawano substrat - tetrametylobenzydynamę i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Tetrametylobenzydynam jest substratem dla peroksydazy chrzanowej. Efektem reakcji katalizowanej przez peroksydazę chrzanową jest zmiana zabarwienia badanego materiału z bezbarwnego na niebieski. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie buforu STOP, którym jest kwas siarkowy. Dodanie kwasu siarkowego powoduje zatrzymanie reakcji katalizowanej przez peroksydazę chrzanową i zmianę zabarwienia roztworu na żółtą. Intensywność koloru roztworu była zależna od stężenia FL. Pomiaru gęstości optycznej dokonano przy użyciu spektrofotometru Sunrise firmy Tecan Austria i na podstawie dokonanego odczytu wyznaczano stężenia FL w oparciu o krzywą wzorcową. Wyniki analizowano w oparciu o wytyczne producenta, które określono dla dorosłych w następujących zakresach:

0 – 7,24 µg/ml – poziom fizjologiczny

> 7,25 µg/ml – poziom podwyższony

3.2.4 Ocena stężenia kalprotektyny w kale

Aby ocenić przydatność oznaczania FL względem sprawdzonego w diagnostyce i monitorowaniu NChZJ kopromarkera jakim jest FC, u pacjentów oznaczono także stężenie wymienionej FC. W tym celu od każdego pacjenta pobierano próbkę kału w ilości minimum 5 g i mrożono w temperaturze -20°C do momentu wykonania badania, nie dłużej jednak niż przez 12 miesięcy. Przed wykonaniem pomiaru próby rozmrażano w temperaturze pokojowej. Do oznaczenia stężenia FC w kale zastosowano test PhiCal Calprotectin Elisa Kit firmy Immundiagnostik. Z oddawanej przez pacjentów próbki kału pobierano do badania 100 mg kału. Następnie dodawano 5 ml buforu ekstrakcyjnego i poddawano homogenizacji przez około 30 sekund (w zależności od konsystencji). Po tym czasie materiał wirowano przez 5 minut, przy prędkości 13000g. Otrzymany supernatant rozcieńczano w proporcji 1:50. Następnie do studzienek reakcyjnych opłaszczonych przeciwciałami króliczymi przeciwko kalprotektynie наносono 100 μl badanego materiału, roztworów standardowych oraz kontroli. Płytkę reakcyjną poddawano godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C . Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną pięciokrotnie przepłukiwano buforem płuczącym, a następnie dodawano koniugatu zawierającego przeciwciała królicze klasy IgG znaczone alkaliczną fosfatazą przeciwko kalprotektynie. Kolejna inkubacja trwała 10 – 20 minut i prowadzona była w zaciemnieniu w temperaturze pokojowej ($18 - 26^{\circ}\text{C}$). Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie buforu STOP. Gęstość optyczną odczytywano przy użyciu spektrofotometru Sunrise firmy Tecan Austria. Na podstawie dokonanego odczytu wyznaczano stężenia FC w oparciu o krzywą wzorcową.

3.2.5 Badania obrazowe i endoskopowe

Wszyscy pacjenci, u których było to możliwe ze względów medycznych, zostali poddani badaniom endoskopowym. Ostatecznie u 81 pacjentów wykonano kolonoskopię. Badanie to było przeprowadzone przez lekarza specjalistę z zakresu gastroenterologii w Centralnej Pracowni Endoskopowej Szpitala Klinicznego im. H. Świącickiego w Poznaniu. Badanie odbywało się w znieczuleniu pod nadzorem lekarza specjalisty anestezjologii oraz pielęgniarki anestezjologicznej. Przygotowanie do badania odbywało się w sposób standardowy. Oceny aktywności zmian endoskopowych dokonywano za pomocą skali SES-CD (Tabela 5), wyliczając całkowitą wartość punktową (tzw. *total* SES-CD) oraz

osobną dla zmian w obrębie jelita krętego (tzw. *ileal* SES-CD) oraz jelita grubego (tzw. *colonic* SES-CD) [47]. Za remisję zmian endoskopowych w obrębie jelita grubego przyjęto wartość *colonic* SES-CD ≤ 3 punktów [47,90,94,97].

Oceny nasilenia zmian zapalnych w zakresie jelita cienkiego dokonywano za pomocą MRE. Badanie to przeprowadzono u 81 pacjentów według identycznego protokołu badawczego. Dzień przed badaniem chorzy pozostawali na diecie płynnej, a następnie w godzinach popołudniowych przyjmowali środek przeczyszczający (zwykle 2 saszetki preparatu Fortrans®). W dniu badania pacjenci pozostawali na czczo przez co najmniej 6 godzin przed badaniem, a 30 minut przed MRE wypijali 1500 ml roztworu polietylenoglikolu. Dodatkowo, aby zmniejszyć ruchy perystaltyczne, podawano dożylnie 40 mg buskopolizyny przed podaniem dożylnego środka kontrastowego. Wszystkie badania MRE wykonywano wykorzystując aparat 1.5 Tesla Siemens Avanto (Erlangen, Niemcy) w Ośrodku Diagnostyki Obrazowej Szpitala Klinicznego im. H. Święcickiego w Poznaniu. Obrazowanie obejmowało następujące sekwencje:

- a) *True fast imaging with steady-state free precession* (TrueFISP) w płaszczyźnie czołowej i poprzecznej celem oceny anatomicznej wraz z oceną poszerzenia pętli jelitowych i pogrubienia ściany przewodu pokarmowego
- b) *Single shot turbo spin echo sequence with fat suppression* (HASTE) w płaszczyźnie czołowej do oceny nacieku zapalnego/obrzęku ściany przewodu pokarmowego i struktur otaczających, w tym okolojelitowej tkanki tłuszczowej
- c) *Cine loop sequence with retro steady-state free precession* do oceny motoryki jelita oraz obecności zwężeń
- d) *Fat-suppressed 3D T1-weighted volumetric interpolated breath-hold examination* (VIBE) przed podaniem oraz trzykrotnie po podaniu gadolinowego środka kontrastującego (30 sekund, 90 sekund i 5 minut po kontraście) w dawce 0.1 mmol/kg masy ciała (z następowym podaniem 20 ml 0,9% soli fizjologicznej) dożylnie do oceny nasilenia i aktywności procesu zapalnego.

Oceny aktywności zmian dokonywano za pomocą skali SEAS-CD (Tabela 4) [43]. W ramach tej oceny wyliczano całkowitą aktywność ChLC (tzw. *total* SEAS-CD), na którą składa się aktywność zmian w jelicie czczym (tzw. *jejunal* SEAS-CD) i krętym (tzw. *ileal*

SEAS-CD) [43]. Za remisję ChLC w obrębie jelita cienkiego przyjęto wartość poniżej 6 punktów sumy *jejunal* oraz *ileal* SEAS-CD.

3.2.6 Analiza przydatności diagnostycznej FL w różnych lokalizacjach zmian zapalnych w ChLC

W celu oceny przydatności diagnostycznej oznaczania FL w różnych lokalizacjach zmian zapalnych w ChLC, dokonano analizy korelacji stężenia FL z metodami uznawanymi za tzw. „złoty standard” diagnostyczny. W odniesieniu do postaci L1 za metodę odniesienia uznano MRE (skala SEAS-CD), a w przypadku postaci L2 – ocenę endoskopową (*colonic* SES-CD). W przypadku pacjentów ze zmianami zapalnymi zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym – posłużono się złożonym parametrem, określanym mianem *Global Crohn's Disease Activity Score* - GCDAS [43]. GCDAS jest sumą oceny aktywności choroby w jelicie cienkim w MRE (SEAS-CD) oraz endoskopowej aktywności w jelicie grubym (*colonic* SES-CD) [43].

3.2.7 Analiza statystyczna

Analizy statystycznej dokonano za pomocą programu Statistica przy współpracy z Katedrą i Zakładem Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Dla ocenianych wartości wyliczono średnie, odchylenia standardowe oraz mediany z podaniem wartości minimum i maksimum oraz wartość 25% i 75% percentyla.

Oceny normalności rozkładu wartości mierzonych na skali interwałowej dokonywano za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa. Dla wartości mierzonych na skali interwałowej z brakiem rozkładu normalnego lub wartości mierzonych na skali porządkowej posłużono się testem Wilcoxon dla zmiennych powiązanych lub testem Manna-Whitneya dla zmiennych niepowiązanych.

W oszacowaniu korelacji dla zmiennych mierzonych na skali interwałowej lub porządkowej w przypadku braku rozkładu normalnego posłużono się korelacjami porządku rang Spearmana. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

W celu określenia punktu odcięcia poziomu FL, poniżej którego można przewidywać remisję ChLC, posłużono się krzywą ROC (*ang.* receiver operating characteristic curve).

Aktywność ChLC w tej części analizy definiowano na podstawie oceny endoskopowej (SES-CD) oraz na podstawie skali odnoszącej się do całkowitej aktywności choroby (uwzględniającej także zmiany zapalne w jelicie cienkim, uwidocznione w MRE) – czyli GCDAS. Optymalny punkt odcięcia oszacowano przy pomocy indeksu Youdena. Dla wyliczonego punktu odcięcia podano czułość i swoistość diagnostyczną, a ocenę jakości diagnostycznej krzywej oceniono na podstawie tzw. pola pod powierzchnią krzywej AUC (*ang.* area under the curve).

Celem potwierdzenia przydatności FL w prognozowaniu aktywności ChLC zlokalizowanej w jelicie grubym, definiowanej na podstawie wartości *colonic* SES-CD oraz w ramach sprawdzenia czy inne parametry, niż FL mogą być pomocne w określaniu remisji endoskopowej ChLC, zastosowano dodatkowe, uzupełniające obliczenia statystyczne w postaci regresji wielorakiej wstecznej.

3.2.8 Zagadnienia etyczne

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 335/14). Każdy pacjent podpisał stosowną, świadomą zgodę na udział w badaniu.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka całej grupy badanej

4.1.1 Statystyka opisowa

Charakterystykę kliniczną całej grupy badanej (n=101) omówiono w rozdziale 3.1 (Tabela 6). Stężenie FL, wyniki badań laboratoryjnych, aktywność zmian chorobowych w ocenie kolonoskopowej (*total* SES-CD i *colonic* SES-CD) oraz w MRE (skala SEAS-CD) przedstawiono w Tabeli 10 [90]. W Tabeli tej przedstawiono również całkowitą aktywności ChLC z uwzględnieniem zarówno oceny endoskopowej, jak i radiologicznej w postaci skali GCDAS, która w przypadku pacjentów z izolowanymi zmianami w obrębie jelita cienkiego była równa wartości SEAS-CD, w grupie chorych ze zmianami tylko w obrębie jelita grubego stanowiła wartość *colonic* SES-CD, natomiast w postaci choroby ze zmianami w obrębie jelita cienkiego i grubego była równa sumie *colonic* SES-CD oraz SEAS-CD.

Tabela 10. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych w całej grupie badanej

Jednostka pomiarowa	Średnia	Odchylenie standardowe (SD)	Mediana	25% Percentyl	75% Percentyl
Laktoferyna (µg/ml)	307,6	494,3	84,14	35,04	311,3
Kalprotektyna (mg/l)	190,1	221,5	143,2	63,7	227,7
CRP (mg/l)	18,62	28,96	9,1	3,15	20,33
CDAI (pkt.)	230	125	206	140	317
Fibrynogen (mg/dl)	421,5	111,2	412	345,5	501
WBC (tys/mm ³)	7,62	3,27	6,98	5,55	9,16
OB (mm/h)	26	19	19	12	35
PLT (tys/mm ³)	344	94	324	278	426
Hgb (g/dl)	12,72	1,88	13,15	11,55	13,9
SES-CD	11	9	9	3	17
<i>Colonic</i> SES-CD	7	8	3	0	12
SEAS-CD	9	6	9	5	13
GCDAS	15	8	14	9	20

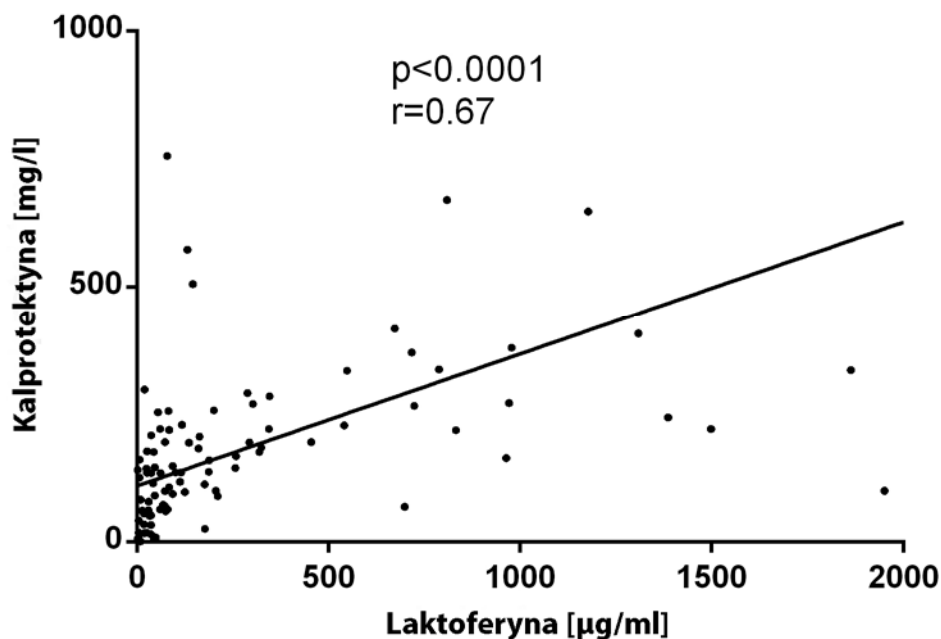
4.1.2 Analiza korelacji i krzywe ROC

Dokonano analizy korelacji między stężeniem FL a pozostałymi ocenianymi parametrami, a także między wynikami wybranych badań biochemicznych, parametrami klinicznymi i aktywnością endoskopową oraz radiologiczną ChLC. Wyniki przedstawiono w Tabeli 11 [90]. Pogrubioną czcionką zaznaczono zależności istotne statystycznie.

Tabela 11. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań endoskopowych i obrazowych w całej grupie badanej (n=101)

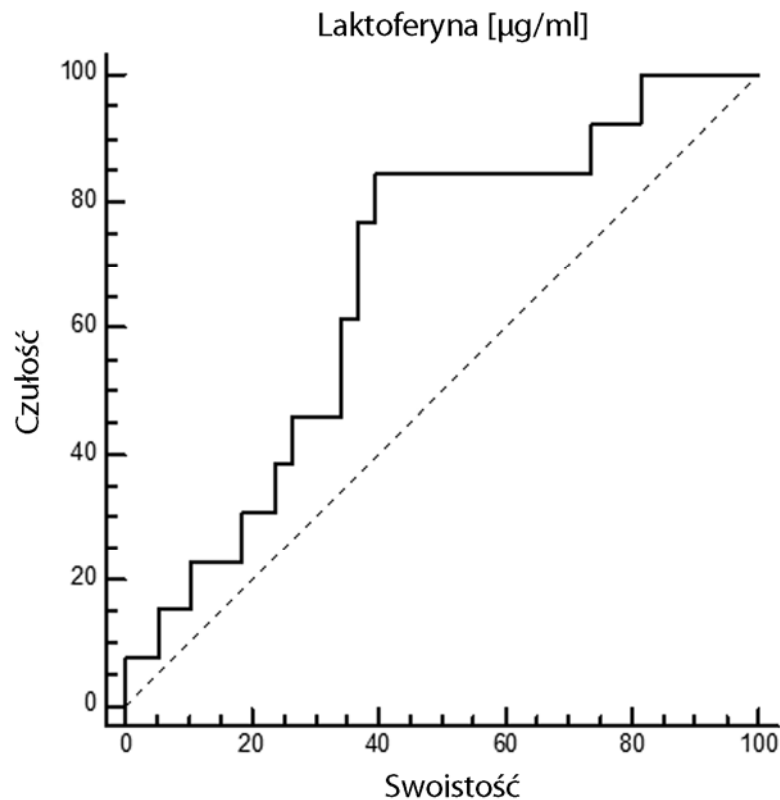
	FL (µg/ml)	CRP (mg/l)	CDAI (pkt.)	Fibrynogen (mg/dl)	WBC (tys/mm ³)	OB (mm/h)	PLT (tys/mm ³)	Hgb (g/dl)	Total SES-CD	Colonic SES-CD	SEAS-CD	GCDAS
FL (µg/ml)	×	p=0,000001 r=0,4916	p=0,0028 r=0,304	p=0,1164 r=0,1791	p=0,088 r=0,1706	p=0,0151 r=0,2434	p=0,03 r=0,2171	p=0,155 r=-0,1432	p=0,00001 r=0,5074	p=0,000004 r=0,4891	p=0,602 r=0,0556	p=0,0001 r=0,4506
CRP (mg/l)	p=0,000001 r=0,4916	×	p=0,0005 r=0,3509	p=0,00001 r=0,6455	p=0,0043 r=0,2816	p=0,00001 r=0,4574	p=0,00001 r=0,4313	p=0,5808 r=-0,0558	p=0,0072 r=0,3551	p=0,0014 r=0,3485	p=0,3367 r=0,1024	p=0,0013 r=0,3529
CDAI (pkt.)	p=0,0028 r=0,304	p=0,0005 r=0,3509	×	p=0,0134 r=0,29	p=0,4885 r=0,0723	p=0,00001 r=0,4542	p=0,0096 r=0,2672	p=0,0451 r=-0,2082	p=0,00001 r=0,5492	p=0,0007 r=0,3725	p=0,0923 r=0,1837	p=0,0003 r=0,3972
Fibrynogen (mg/dl)	p=0,1164 r=0,1791	p=0,00001 r=0,6455	p=0,0134 r=0,29	×	p=0,114 r=0,1803	p=0,00001 r=0,5817	p=0,00001 r=0,4598	p=0,7934 r=-0,0303	p=0,3756 r=0,1385	p=0,5231 r=0,0833	p=0,7884 r=0,0326	p=0,4621 r=0,0959
WBC (tys/mm ³)	p=0,088 r=0,1706	p=0,0043 r=0,2816	p=0,4885 r=0,0723	p=0,114 r=0,1803	×	p=0,728 r=0,0353	p=0,0024 r=0,2991	p=0,0411 r=0,2045	p=0,9591 r=-0,007	p=0,3667 r=0,1016	p=0,1922 r=-0,1387	p=0,9943 r=-0,0008
OB (mm/h)	p=0,0151 r=0,2434	p=0,00001 r=0,4574	p=0,00001 r=0,4542	p=0,00001 r=0,5817	p=0,728 r=0,0353	×	p=0,0112 r=0,255	p=0,00001 r=-0,4031	p=0,0015 r=0,4124	p=0,0004 r=0,3852	p=0,3743 r=-0,0958	p=0,0556 r=0,2162
PLT (tys/mm ³)	p=0,03 r=0,2171	p=0,00001 r=0,4313	p=0,0096 r=0,2672	p=0,00001 r=0,4598	p=0,0024 r=0,2991	p=0,0112 r=0,255	×	p=0,06 r=-0,1896	p=0,11 r=0,2178	p=0,9036 r=-0,0137	p=0,0477 r=0,2104	p=0,1584 r=0,1602
Hgb (g/dl)	p=0,155 r=-0,1432	p=0,5808 r=-0,0558	p=0,0451 r=-0,2082	p=0,7934 r=-0,0303	p=0,0411 r=0,2045	p=0,00001 r=-0,4031	p=0,06 r=-0,1896	×	p=0,0938 r=-0,2281	p=0,0406 r=-0,2294	p=0,9547 r=0,0061	p=0,0872 r=-0,1936
Total SES-CD	p=0,00001 r=0,5074	p=0,0072 r=0,3551	p=0,00001 r=0,5492	p=0,3756 r=0,1385	p=0,9591 r=-0,007	p=0,0015 r=0,4124	p=0,11 r=0,2178	p=0,0938 r=-0,2281	×	p=0,00001 r=0,763	p=0,5234 r=0,0896	p=0,00001 r=0,7508
Colonic SES-CD	p=0,000004 r=0,4891	p=0,0014 r=0,3485	p=0,0007 r=0,3725	p=0,5231 r=0,0833	p=0,3667 r=0,1016	p=0,0004 r=0,3852	p=0,9036 r=-0,0137	p=0,0406 r=-0,2294	p=0,00001 r=0,763	×	p=0,0106 r=-0,2895	p=0,00001 r=0,5778
SEAS-CD	p=0,602 r=0,0556	p=0,3367 r=0,1024	p=0,0923 r=0,1837	p=0,7884 r=0,0326	p=0,1922 r=-0,1387	p=0,3743 r=-0,0958	p=0,0477 r=0,2104	p=0,9547 r=0,0061	p=0,5234 r=0,0896	p=0,0106 r=-0,2895	×	p=0,00001 r=0,5701
GCDAS	p=0,00001 r=0,4506	p=0,0013 r=0,3529	p=0,0003 r=0,3972	p=0,4621 r=0,0959	p=0,9943 r=-0,0008	p=0,0556 r=0,2162	p=0,1584 r=0,1602	p=0,0872 r=-0,1936	p=0,00001 r=0,7508	p=0,00001 r=0,5778	p=0,00001 r=0,5701	×

Dodatkowo w całej grupie badanej dokonano oceny korelacji FL względem FC uzyskując istotnie statystycznie wynik: $p < 0,0001$, $r = 0,67$ (Ryc. 3).



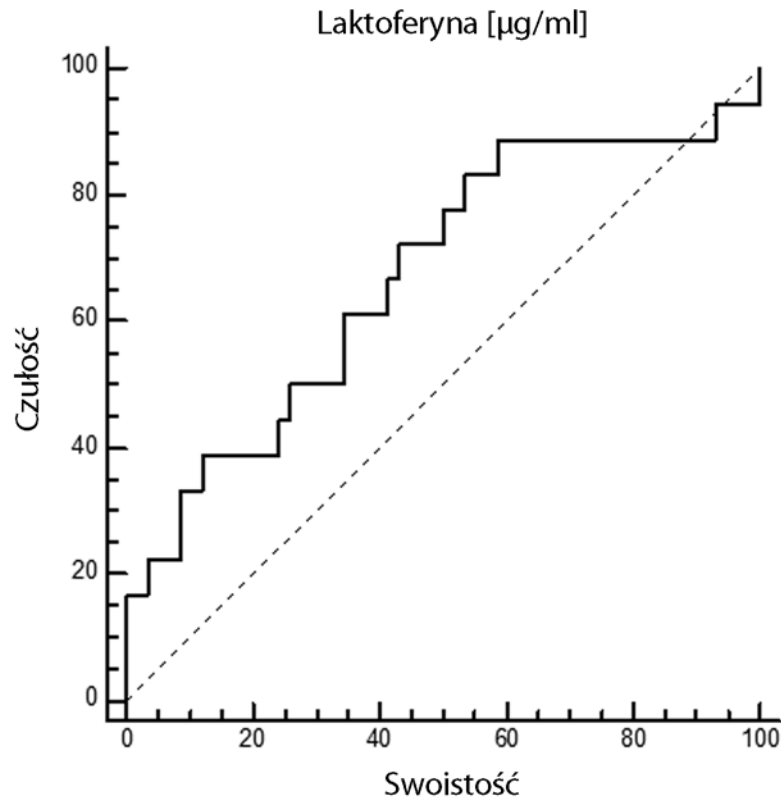
Rycina 3. Korelacja stężenia laktoferyny ze stężeniem kalprotektyny w kale w całej grupie badanej.

Zakładając endoskopową remisję ChLC w jelicie grubym przy wartości *colonic* SES-CD ≤ 3 punktów, wykreślono krzywą ROC poszukując optymalnego punktu odcięcia dla stężenia FL, różnicującego remisję od aktywnej postaci ChLC (Ryc. 4). AUC wynosiło 0,676 [95% CI: 0,531-0,8] ($p = 0,0347$). Optymalny punkt odcięcia dla stężenia FL wyniósł 145,82 $\mu\text{g/ml}$ [90]. Charakteryzował się on 84,62% czułością oraz 60,53% swoistością dla różnicowania pacjentów w stanie remisji od pacjentów w fazie aktywnej ChLC w ocenie endoskopowej. Stężenie to charakteryzowało się pozytywną i negatywną wartością predykcyjną (*ang.* positive predictive value – PPV; negative predictive value - NPV) równą odpowiednio 42,3% i 92%.



Rycina 4. Krzywa ROC (ang. receiver operating characteristic curve) dla oceny wartości FL, pozwalającej na różnicowanie aktywnej i nieaktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna w odniesieniu do aktywności endoskopowej.

Analogiczną analizę przydatności diagnostycznej FL przeprowadzono również w odniesieniu do całkowitej aktywności ChLC, mierzonej wartością GCDAS. Za remisję ChLC przyjęto następujące wartości GCDAS: ≤ 6 pkt. u chorych z izolowanym zajęciem jelita cienkiego przez proces zapalny (w tej grupie GCDAS = SEAS-CD), ≤ 3 pkt. w przypadku pacjentów z postacią L2 (w tej grupie GCDAS = *colonic* SES-CD) oraz ≤ 9 pkt. w przypadku pacjentów z lokalizacją choroby w jelicie cienkim i grubym (u tych chorych GCDAS = *colonic* SES-CD + SEAS-CD). Wykreślona krzywa ROC (Ryc. 5) określiła optymalny punkt odcięcia dla stężenia FL na poziomie 187,75 $\mu\text{g/ml}$. AUC wynosiło 0,671 [95% CI: 0,554 - 0,775] ($p=0,0285$). Stężenie to charakteryzowało się 88,89% czułością oraz 41,38% swoistością dla różnicowania pacjentów w stanie remisji od pacjentów w fazie aktywnej ChLC. PPV wyniosła 32 %, natomiast NPV - 92 %.



Rycina 5. Krzywa ROC (ang. receiver operating characteristic curve) dla oceny wartości FL, pozwalającej na różnicowanie aktywnej i nieaktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna w odniesieniu do całkowitej aktywności choroby, ocenianej zarówno endoskopowo, jak i w enterografii rezonansu magnetycznego.

4.1.3 Analiza wyników regresji wielorakiej

Przeprowadzając analizę regresji wielorakiej wstecznej w celu pogłębienia oceny, czy i jakie parametry pozwalają na prognozowanie istotnej aktywności endoskopowej ChLC (*colonic SES-CD* > 3 pkt.), uwzględniono następujące zmienne: FL, CRP, CDAI, WBC, PLT, Hgb, fibrynogen i OB. Analiza potwierdziła, że najistotniejsze znaczenie w tym aspekcie ma FL ($p=0.00006$; współczynnik standaryzowany $b^*=0.5$), a w drugiej kolejności CDAI ($p=0.004$; współczynnik standaryzowany $b^*=0.3$). Pozostałe oceniane parametry wykazywały graniczną z punktu widzenia statystycznego przydatność w różnicowaniu aktywnej od nieaktywnej endoskopowo postaci ChLC (WBC, PLT) lub nie wykazywały jej wcale w tej analizie.

4.2 Charakterystyka grupy pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim – podgrupa L1

4.2.1 Statystyka opisowa

Podgrupa pacjentów z lokalizacją choroby wyłącznie w jelicie cienkim składała się z 39 pacjentów, w tym z 11 kobiet oraz 28 mężczyzn. Charakterystykę kliniczną grupy badanej przedstawiono rozdziale 3.1. (Tabela 7). Stężenie FL, wyniki badań laboratoryjnych, aktywność zmian chorobowych w MRE (skala SEAS-CD) przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z izolowaną lokalizacją zmian w jelicie cienkim (L1)

Jednostka pomiarowa	Średnia	Odchylenie standardowe (SD)	Mediana	25% Percentyl	75% Percentyl
Laktoferyna (µg/ml)	110,3	159,9	61,16	26,48	116,8
CRP (mg/l)	9	8,64	6,1	2,85	14,83
CDAI (pkt.)	199	107	189	106	291
Fibrynogen (mg/dl)	412,2	93,1	399,4	360,8	471
WCB (tys/mm ³)	7,21	3,13	6,4	5,4	8,21
OB (mm/h)	18	11	16	8	25
PLT (tys/mm ³)	342	91	319	274	412
Hgb (g/dl)	12,72	1,94	13,1	12,1	13,9
SEAS CD	11	6	12	8	15

4.2.2 Analiza korelacji

Dokonano analizy korelacji między stężeniem FL a pozostałymi ocenianymi parametrami, a także między wynikami wybranych badań biochemicznych, parametrami klinicznymi i aktywnością radiologiczną ChLC. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13. Pogrubioną czcionką zaznaczono zależności istotne.

Tabela 13. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań obrazowych w podgrupie L1 (izolowane zmiany chorobowe w jelicie cienkim)

	Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	CRP (mg/l)	CDAI (pkt.)	Fibrynogen (mg/dl)	WBC (tys/mm^3)	OB (mm/h)	PLT (tys/mm^3)	Hgb (g/dl)	SEAS-CD
Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	×	p=0,068452 r=0,291043	p=0,439447 r=0,291043	p=0,227487 r=0,21255	p=0,517625 r=0,105357	p=0,29759 r=-0,17348	p=0,109299 r=0,257072	p=0,417985 r=0,133452	p=0,004519 r=0,456428
CRP (mg/l)	p=0,068452 r=0,291043	×	p=0,695427 r=0,065634	p=0,001613 r=0,520184	p=0,207563 r=0,203632	p=0,51436 r=0,109107	p=0,046151 r=0,317145	p=0,08779 r=0,277001	p=0,998885 r=-0,000237
CDAI (pkt.)	p=0,439447 r=0,129207	p=0,695427 r=0,065634	×	p=0,143091 r=0,260535	p=0,309824 r=-0,16921	p=0,048365 r=0,331357	p=0,203077 r=0,211198	p=0,206137 r=-0,21276	p=0,096496 r=0,281316
Fibrynogen (mg/dl)	p=0,227487 r=0,21255	p=0,001613 r=0,520184	p=0,143091 r=0,260535	×	p=0,962363 r=-0,00841	p=0,004159 r=0,485763	p=0,000704 r=0,552473	p=0,908423 r=-0,02082	p=0,963331 r=0,008464
WBC (tys/mm^3)	p=0,517625 r=0,105357	p=0,207563 r=0,203632	p=0,309824 r=-0,16921	p=0,962363 r=-0,00841	×	p=0,176895 r=-0,22375	p=0,593994 r=0,086879	p=0,010741 r=0,404052	p=0,086077 r=-0,28607
OB (mm/h)	p=0,29759 r=-0,17348	p=0,51436 r=0,109107	p=0,048365 r=0,331357	p=0,004159 r=0,485763	p=0,176895 r=-0,22375	×	p=0,543549 r=0,101683	p=0,020558 r=-0,37941	p=0,62329 0,085996
PLT (tys/mm^3)	p=0,109299 r=0,257072	p=0,046151 r=0,317145	p=0,203077 r=0,211198	p=0,000704 r=0,552473	p=0,593994 r=0,086879	p=0,543549 r=0,101683	×	p=0,192783 r=-0,21308	p=0,700821 r=0,065339
Hgb (g/dl)	p=0,417985 r=0,133452	p=0,08779 r=0,277001	p=0,206137 r=-0,21276	p=0,908423 r=-0,02082	p=0,010741 r=0,404052	p=0,020558 r=-0,37941	p=0,192783 r=-0,21308	×	p=0,774534 r=-0,04946
SEAS-CD	p=0,004519 r=0,456428	p=0,998885 r=-0,000237	p=0,096496 r=0,281316	p=0,963331 r=0,008464	p=0,086077 r=-0,28607	p=0,62329 r=0,085996	p=0,700821 r=0,065339	p=0,774534 r=-0,04946	×

4.3 Charakterystyka grupy pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie grubym - podgrupa L2

4.3.1 Statystyka opisowa

Podgrupa pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie grubym składała się z 24 pacjentów. W skład podgrupy L2 wchodziło 14 kobiet oraz 10 mężczyzn. Charakterystykę kliniczną tej podgrupy przedstawiono w rozdziale 3.1 (Tabela 8). Stężenie FL, wyniki badań laboratoryjnych, aktywność zmian chorobowych w ocenie kolonoskopowej (*total SES-CD* i *colonic SES-CD*) przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z izolowaną lokalizacją zmian w jelicie grubym (L2)

Jednostka pomiarowa	Średnia	Odchylenie standardowe (SD)	Mediana	25% Percentyl	75% Percentyl
Laktoferyna (µg/ml)	505,1	661,4	223,4	38,43	772,1
CRP (mg/l)	29,55	46,05	14,12	1,25	37,68
CDAI (pkt.)	215	138	201	79	335
Fibrynogen (mg/dl)	416,9	114,2	451	329	521
WCB (tys/mm ³)	8,14	3,02	7,38	6,17	9,88
OB. (mm/h)	32	24	24	13	43
PLT (tys/mm ³)	319	85,7	298	242,5	375,8
Hgb (g/dl)	12,61	1,751	13,3	11,7	13,6
<i>Total SES-CD</i>	13	11	12	0	20
<i>Colonic SES-CD</i>	12	10	13	3	19

4.3.2 Analiza korelacji

Dokonano analizy korelacji między stężeniem FL a pozostałymi ocenianymi parametrami, a także między wynikami wybranych badań biochemicznych, parametrami klinicznymi i aktywnością endoskopową ChLC. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15. Pogrubioną czcionką zaznaczono zależności istotne statystycznie.

Tabela 15. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań endoskopowych w podgrupie L2 (izolowane zmiany chorobowe w jelicie grubym)

	Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	CRP (mg/l)	CDAI (pkt.)	Fibrynogen (mg/dl)	WBC (tys/mm^3)	OB (mm/h)	PLT (tys/mm^3)	Hgb (g/dl)	Total SES-CD	Colonic SES-CD
Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	×	p=0,0028 r=0,5815	p=0,0896 r=0,3705	p=0,3207 r=0,2647	p=0,0258 r=0,4539	p=0,0989 r=0,3447	p=0,0723 r=0,3733	p=0,3353 r=-0,2054	p=0,0822 r=0,4827	p=0,0001 r=0,7768
CRP (mg/l)	p=0,0028 r=0,5815	×	p=0,03 r=0,4628	p=0,0061 r=0,6647	p=0,2427 r=0,2479	p=0,00001 r=0,7301	p=0,0064 r=0,5402	p=0,0094 r=-0,5185	p=0,0719 r=0,4983	p=0,0047 r=0,6331
CDAI (pkt.)	p=0,0896 r=0,3705	p=0,03 r=0,4628	×	p=0,3099 r=0,2923	p=0,4757 r=0,1604	p=0,0071 r=0,5565	p=0,5220 r=0,1441	p=0,3632 r=-0,2036	p=0,0362 r=0,5690	p=0,0652 r=0,4435
Fibrynogen (mg/dl)	p=0,3207 r=0,2647	p=0,0061 r=0,6647	p=0,3099 r=0,2923	×	p=0,5862 r=0,147	p=0,0356 r=0,5328	p=0,1447 r=0,3823	p=0,2697 r=-0,288	p=0,9134 r=0,0508	p=0,728 r=0,1184
WBC (tys/mm^3)	p=0,0258 r=0,4539	p=0,2427 r=0,2479	p=0,4757 r=0,1604	p=0,5862 r=0,147	×	p=0,2855 r=0,2272	p=0,0571 r=0,3933	p=0,9403 r=-0,0161	p=0,8505 r=-0,0422	p=0,2094 r=0,3107
OB (mm/h)	p=0,0989 r=0,3447	p=0,00001 r=0,7301	p=0,0071 r=0,5565	p=0,0356 r=0,5328	p=0,2855 r=0,2272	×	p=0,0015 r=0,6095	p=0,0177 r=-0,4794	p=0,0141 r=0,651	p=0,1101 r=0,3894
PLT (tys/mm^3)	p=0,0723 r=0,3733	p=0,0064 r=0,5402	p=0,522 r=0,1441	p=0,1447 r=0,3823	p=0,0571 r=0,3933	p=0,0015 r=0,6095	×	p=0,3695 r=-0,1917	p=0,0747 r=0,4938	p=0,0054 r=0,6258
Hgb (g/dl)	p=0,3353 r=-0,2054	p=0,0094 r=-0,5185	p=0,3632 r=-0,2036	p=0,2697 r=-0,2880	p=0,9403 r=-0,0161	p=0,0177 r=-0,4794	p=0,3695 r=-0,1917	×	p=0,3765 r=-0,2349	p=0,2821 r=-0,268
Total SES-CD	p=0,0822 r=0,4827	p=0,0719 r=0,4983	p=0,0362 r=0,569	p=0,9134 r=0,0508	p=0,8505 r=-0,0422	p=0,0141 r=0,6510	p=0,0747 r=0,4938	p=0,3765 r=-0,2349	×	p=0,0002 r=0,8473
Colonic SES-CD	p=0,0001 r=0,7768	p=0,0047 r=0,6331	p=0,0652 r=0,4435	p=0,728 r=0,1184	p=0,2094 r=0,3107	p=0,1101 r=0,3894	p=0,0054 r=0,6258	p=0,2821 r=-0,268	p=0,0002 r=0,8473	×

4.4 Charakterystyka grupy pacjentów z lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim oraz grubym - podgrupa L3

4.4.1 Statystyka opisowa

Podgrupa pacjentów z lokalizacją zmian chorobowych zarówno w jelicie cienkim jak i grubym składała się z 38 pacjentów. W skład podgrupy L3 wchodziło 19 kobiet oraz 19 mężczyzn. Charakterystykę kliniczną grupy badanej przedstawiono w rozdziale 3.1. (Tabela 9). Stężenie FL, wyniki badań laboratoryjnych, aktywność zmian chorobowych w ocenie kolonoskopowej (*total* SES-CD i *colonic* SES-CD) oraz w MRE (skala SEAS-CD) przedstawiono w Tabeli 16. W Tabeli tej przedstawiono również całkowitą aktywność ChLC z uwzględnieniem zarówno oceny endoskopowej, jak i radiologicznej w postaci skali GCDAS, która była równa sumie *colonic* SES-CD oraz SEAS-CD.

Tabela 16. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z lokalizacją zmian zapalnych w jelicie cienkim i grubym (L3)

Jednostka pomiarowa	Średnia	Odchylenie standardowe (SD)	Mediana	25% Percentyl	75% Percentyl
Laktoferyna (µg/ml)	382,6	539,2	133,5	41	509,5
CRP (mg/l)	21,37	26,33	11,7	3,275	28,05
CDAI (pkt.)	269	130	281	170	350
Fibrynogen (mg/dl)	432,9	129,1	422	338,5	561
WCB (tys/mm ³)	7,71	3,54	7,14	5,52	9,12
OB (mm/h)	29	20	21	14	46
PLT (tys/mm ³)	357,5	102,7	331	293,5	440,5
Hgb (g/dl)	12,8	1,936	12,55	11,38	14,4
<i>Total</i> SES-CD	14	9	14	7	19
<i>Colonic</i> SES-CD	10	7	9	4	13
SEAS-CD	11	5	11	8	14
GCDAS	19	9	19	12	26

4.4.2 Analiza korelacji

Dokonano analizy korelacji między stężeniem FL a pozostałymi ocenianymi parametrami, a także między wynikami wybranych badań biochemicznych, parametrami klinicznymi, aktywnością endoskopową ChLC i aktywnością ocenianą w MRE. Wyniki przedstawiono w Tabeli 17. Pogrubioną czcionką zaznaczono zależności istotne statystycznie

Tabela 17. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań obrazowych i endoskopowych w podgrupie L3 (zmiany chorobowe w jelicie cienkim i grubym)

	Laktoferyna (µg/ml)	CRP (mg/l)	CDAI	Fibrynogen (mg/dl)	WBC (tys/mm ³)	OB. (mm/h)	PLT (tys/mm ³)	Hgb (g/dl)	Total SES-CD	Colonic SES-CD	SEAS-CD	Global-CD
Laktoferyna (µg/ml)	×	p=0,0002 r=0,5609	p=0,0103 r=0,4279	p=0,2319 r=0,229	p=0,9345 r=-0,0137	p=0,0184 r=0,3804	p=0,1155 r=0,2631	p=0,0507 r=-0,3191	p=0,0011 r=0,602	p=0,0048 r=0,4721	p=0,5154 r=0,112	p=0,0022 r=0,4866
CRP (mg/l)	p=0,0002 r=0,5609	×	p=0,0013 r=0,5217	p=0,0001 r=0,6401	p=0,0275 r=0,3575	p=0,0116 r=0,4048	p=0,0009 r=0,5203	p=0,6459 r=-0,0769	p=0,1464 r=0,2928	p=0,0725 r=0,3119	p=0,0083 r=0,4331	p=0,0025 r=0,4817
CDAI	p=0,0103 r=0,4279	p=0,0013 r=0,5217	×	p=0,0843 r=0,3449	p=0,1558 r=0,2451	p=0,0217 r=0,3866	p=0,0087 r=0,4428	p=0,0915 r=-0,2895	p=0,0002 r=0,6804	p=0,00001 r=0,6791	p=0,0974 r=0,2934	p=0,0003 r=0,5791
Fibrynogen (mg/dl)	p=0,2319 r=0,229	p=0,0001 r=0,6401	p=0,0843 r=0,3449	×	p=0,0616 r=0,3512	p=0,00001 r=0,6672	p=0,0221 r=0,4306	p=0,844 r=0,0382	p=0,3944 r=0,2073	p=0,2048 r=0,2625	p=0,7637 r=0,0594	p=0,3303 r=0,1909
WBC (tys/mm ³)	p=0,9345 r=-0,0137	p=0,0275 r=0,3575	p=0,1558 r=0,2451	p=0,0616 r=0,3512	×	p=0,6386 r=0,0786	p=0,0041 r=0,4604	p=0,1831 r=0,2206	p=0,9549 r=-0,0116	p=0,5985 r=-0,0936	p=0,6713 r=0,0732	p=0,8926 r=-0,0229
OB. (mm/h)	p=0,0184 r=0,3804	p=0,0116 r=0,4048	p=0,0217 r=0,3866	p=0,00001 r=0,6672	p=0,6386 r=0,0786	×	p=0,1639 r=0,2336	p=0,0070 r=-0,4296	p=0,1441 r=0,2945	p=0,0081 r=0,4463	p=0,3261 r=-0,1684	p=0,1366 r=0,2493
PLT (tys/mm ³)	p=0,1155 r=0,2631	p=0,0009 r=0,5203	p=0,0087 r=0,4428	p=0,0221 r=0,4306	p=0,0041 r=0,4604	p=0,1639 r=0,2336	×	p=0,1487 r=-0,2421	p=0,1729 r=0,2813	p=0,5431 r=0,1097	p=0,3229 r=0,172	p=0,7212 r=0,0615
Hgb (g/dl)	p=0,0507 r=-0,3191	p=0,6459 r=-0,0769	p=0,0915 r=-0,2895	p=0,844 r=0,0382	p=0,1831 r=0,2206	p=0,007 r=-0,4296	p=0,1487 r=-0,2421	×	p=0,0588 r=-0,3753	p=0,0021 r=-0,5078	p=0,5615 r=0,1	p=0,0655 r=-0,3058
Total SES-CD	p=0,0011 r=0,602	p=0,1464 r=0,2928	p=0,0002 r=0,6804	p=0,3944 r=0,2073	p=0,9549 r=-0,0116	p=0,1441 r=0,2945	p=0,1729 r=0,2813	p=0,0588 r=-0,3753	×	p=0,0001 r=0,9124	p=0,3993 r=0,1762	p=0,00001 r=0,7692
Colonic SES-CD	p=0,0048 r=0,4721	p=0,0725 r=0,3119	p=0,0000 r=0,6791	p=0,2048 r=0,2625	p=0,5985 r=-0,0936	p=0,0081 r=0,4463	p=0,5431 r=0,1097	p=0,0021 r=-0,5078	p=0,00001 r=0,9124	×	p=0,4566 r=0,1341	p=0,00001 r=0,8188
SEAS-CD	p=0,5154 r=0,112	p=0,0083 r=0,4331	p=0,0974 r=0,2934	p=0,7637 r=0,0594	p=0,6713 r=0,0732	p=0,3261 r=-0,1684	p=0,3229 r=0,1720	p=0,5615 r=0,1000	p=0,3993 r=0,1762	p=0,4566 r=0,1341	×	p=0,00001 r=0,6433
GCDAS	p=0,0022 r=0,4866	p=0,0025 r=0,4817	p=0,0003 r=0,5791	p=0,3303 r=0,1909	p=0,8926 r=-0,0229	p=0,1366 r=0,2493	p=0,7212 r=0,0615	p=0,0655 r=-0,3058	p=0,00001 r=0,7692	p=0,00001 r=0,8188	p=0,00001 r=0,6433	×

4.5 Porównanie wybranych parametrów oceniających aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna w zależności od lokalizacji zmian zapalnych

W celu oceny, czy lokalizacja zmian zapalnych może mieć – oprócz samej aktywności ChLC – wpływ na wartość stężenia FL, dokonano porównania stężenia FL w stolcu i równoczesnego porównania CRP w surowicy krwi i CDAI pomiędzy wyodrębnionymi podgrupami (L1 vs L2, L1 vs L3, L2 vs L3) (Tabela 18).

Tabela 18. Porównanie stężeń laktoferyny, CRP oraz CDAI w badanej grupie w zależności od lokalizacji zmian chorobowych. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD)

Lokalizacja ChLC	L1	L2	L3	P L1/L2; L1/L3; L2/L3
Laktoferyna (µg/ml)	110,3±159,9	505,1±661,4	382,6±539,2	0,008; 0,01; 0,61
CRP (mg/l)	8,998±8,642	29,55±46,05	21,37±26,33	0,21; 0,01; 0,67
CDAI (pkt.)	198,7 ±106,8	215,4±137,7	268,7±129,6	0,69; 0,01; 0,13

4.6 Porównanie wartości stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby określonej za pomocą CDAI

Dokonano analizy porównawczej stężeń FL w zależności od aktywności klinicznej ChLC, mierzonej indeksem CDAI. Analizę przeprowadzono dla całej grupy badanej oraz wyodrębnionych podgrup. Wyniki przedstawiono w Tabelach 19 - 22.

Tabela 19. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w całej grupie badanej. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD).

CDAI	<150	151-219	≥ 220
Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	103,38 \pm 98,62	282,96 \pm 482,42	441,14 \pm 605,11
<ul style="list-style-type: none"> ➤ CDAI <150 vs CDAI 150-219 p= 0,4642 ➤ CDAI <150 vs CDAI >220 p= 0,022 ➤ CDAI 151-219 vs CDAI >220 p= 0,2331 			

Tabela 20. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w podgrupie L1 (izolowane zmiany w jelicie cienkim). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD).

CDAI	<150	151-219	≥ 220
Laktoferyna ($\mu\text{g/ml}$)	77,18 \pm 78,7	134,45 \pm 202,04	131,44 \pm 198,25
<ul style="list-style-type: none"> ➤ CDAI <150 vs CDAI 150-219 p= 0,5112 ➤ CDAI <150 vs CDAI >220 p > 0,9999 ➤ CDAI 151-219 vs CDAI >220 p= 0,649 			

Tabela 21. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w podgrupie L2 (izolowane zmiany w jelicie grubym). Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD).

CDAI	<150	151-219	≥220
Laktoferyna (µg/ml)	137,19±124,73	693,63±821,24	642,88±757,74
<ul style="list-style-type: none"> ➤ CDAI <150 vs CDAI 150-219 p= 0,4452 ➤ CDAI <150 vs CDAI >220 p= 0,1061 ➤ CDAI 151-219 vs CDAI>220 p= 0,8455 			

Tabela 22. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), wśród chorych z postacią L3 choroby (zmiany zapalne zarówno w jelicie cienkim jak i grubym). Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD).

CDAI	<150	151-219	≥220
Laktoferyna (µg/ml)	108,16±111,8	190,70±297,23	551,66±625,53
<ul style="list-style-type: none"> ➤ CDAI <150 vs CDAI 150-219 p= 0,6889 ➤ CDAI <150 vs CDAI >220 p= 0,1229 ➤ CDAI 151-219 vs CDAI>220 p= 0,2160 			

5. DYSKUSJA

Rozwój medycyny i nauk biologicznych przyczynia się do poszerzania naszej wiedzy, powstawania nowych możliwości diagnostycznych oraz metod leczniczych. Jednak nadal bywa tak, że właściwe postawienie ostatecznego rozpoznania jest trudne i wymaga wiele czasu oraz specjalistycznych badań. Do grupy jednostek chorobowych, które ciągle przysparzają sporo problemów diagnostycznych, jak i leczniczych należą NChZJ. Poniżej omówione zostaną uzyskane wyniki, z analizą przydatności poszczególnych parametrów oceny aktywności ChLC ze szczególnym uwzględnieniem FL.

Oceniając przydatność oznaczania FL w całej grupie badanej, możemy wskazać na potencjalną rolę tego kopromarkera w diagnostyce u wszystkich chorych, niezależnie od przebiegu klinicznego i postaci ChLC. Ocena taka jest uprawniona, ponieważ rozkład lokalizacji zmian chorobowych w grupie badanej był zbliżony do danych epidemiologicznych, które wskazują źródła literaturowe [4]. Najbardziej liczne grupy stanowili pacjenci z lokalizacją w obrębie jelita cienkiego (38,6%) oraz pacjenci z lokalizacją zmian chorobowych zarówno w jelicie cienkim jak i grubym (37,7%). Chorzy z lokalizacją zmian wyłącznie w obrębie jelita grubego stanowili 23,7% wszystkich pacjentów. W omawianej grupie nie uwzględniono chorych, u których choroba dotyczyłaby górnego odcinka przewodu pokarmowego, aby uczynić grupę bardziej homogenną i ułatwić interpretację zebranych danych.

Jak wspomniano powyżej, podstawowym pytaniem, na które w tej części analizy poszukiwano odpowiedzi, jest kwestia przydatności diagnostycznej FL niezależnie od zaawansowania i lokalizacji procesu chorobowego. Warto w tym miejscu jeszcze raz podkreślić, że trudno jest jednoznacznie wskazać w jaki sposób najobiektywniej oceniać aktywność ChLC, biorąc pod uwagę heterogenność jej przebiegu klinicznego, a przede wszystkim uwzględniając różną lokalizację zmian chorobowych. Dlatego też wątek ten należy rozpatrywać w kilku aspektach, które zostaną omówione poniżej.

Ogólny charakter dolegliwości chorobowych i nierzadko mało charakterystyczny początkowy przebieg ChLC nastrocza wiele trudności klinicznych. Zdarza się, że na początku choroby pacjentom z NChZJ przypisuje się zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego. Jest to związane ze znacznie częstszym występowaniem chorób

czynnościowych w populacji ogólnej oraz, po części, z podobną symptomatologią obu grup chorób. Dlatego też średni czas od wystąpienia objawów do postawienia diagnozy w przypadku NChZJ wynosi według większości danych źródłowych ok. 4 - 5 lat [28]. Zbliżone wyniki uzyskano w niniejszej pracy, w której wykazano, że czas ten wyniósł średnio 3 lata. Fakt ten związany jest też z utrzymującymi się niekiedy prawidłowymi wynikami badań dodatkowych, jak morfologia krwi obwodowej, OB czy CRP. Zwłaszcza w odniesieniu do CRP obserwacja ta wydaje się być dość zaskakująca. W większości prac wykazano bowiem dobrą przydatność tego markera w ocenie aktywności zapalenia w NChZJ – zwłaszcza w ChLC [31,93,98-102]. Wynika z nich m.in., że podwyższone wartości CRP korelują z występowaniem ChLC i jej zaostrzeniem. Wykazano także dobrą korelację CRP zarówno z klinicznymi skalami oceny aktywności ChLC, jak i skalami endoskopowymi [93,102,103,104]. Znalazło to potwierdzenie w niniejszej analizie. Należy jednak zaznaczyć, że siła korelacji, zwłaszcza jeśli chodzi o związek ze zmianami stwierdzanymi endoskopowo, jest według danych literaturowych niższa w porównaniu z kopromarkerami, jak FC oraz FL [93,102,103,104]. Także z niniejszego opracowania wynika, że FL bardziej precyzyjnie odzwierciedla nasilenie procesu zapalnego w jelicie grubym, niż CRP czy OB. Obserwacja ta jest istotna z praktycznego punktu widzenia, ponieważ wskazuje na wyższość kopromarkerów, takich jak FL, nad badaniami krwi, w detekcji i ocenie aktywności zapalenia w przewodzie pokarmowym w ChLC. Dodatkowo - znaczenie tej obserwacji nabiera szczególnej wagi, jeśli weźmiemy pod uwagę, że istnieje podgrupa chorych z NChZJ, u których mimo obecności aktywnego procesu zapalnego, wartości CRP pozostają prawidłowe, tak jak wspomniano we wstępie dyskusji. Jest to prawdopodobnie w głównej mierze spowodowane genetycznie uwarunkowaną różną zdolnością wątroby do produkcji tego białka w odpowiedzi na bodziec zapalny [105,106].

Nie wykazano natomiast, aby FL korelowała z aktywnością choroby w jelicie cienkim, ocenianym w MRE w całej grupie badanej. Obserwacja ta nie dziwi, ponieważ wśród wszystkich chorych, analizowanych łącznie, jest szereg pacjentów ze zmianami w jelicie grubym, których obecność nie wpływa na wynik w skali SEAS-CD. Dopiero uwzględnienie heterogenności lokalizacji zmian chorobowych, poprzez wyliczenie całkowitej aktywności ChLC za pomocą parametru GCDAS, pokazuje przydatność kliniczną FL. Warto w tym miejscu wskazać jednak na potencjalne wady takiej oceny zaawansowania zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym. Skala GCDAS łączy bowiem w sobie ocenę różnymi metodami diagnostycznymi. W zakresie jelita grubego jest to kolonoskopia, która umożliwia ocenę

powierzchni śluzówki przewodu pokarmowego, ale nie pozwala na oszacowanie zaawansowania zmian śródściennych czy okołojelitowych. Z drugiej strony MRE, służąca do oceny jelita cienkiego, wykazuje gorszą przydatność w uwidocznieniu zmian śluzówkowych, ale jest doskonałą techniką do zobrazowania procesu chorobowego w głębszych warstwach ściany jelita oraz w obrębie otaczających struktur. Ideałem byłaby jedna metoda, która pozwoliłaby na ocenę całego przewodu pokarmowego z uwzględnieniem różnorodności przebiegu klinicznego ChLC. Taka metoda jednak nie istnieje, a zastosowanie skali GCDAS jest pewnym kompromisem, który pomimo mankamentów, najobiektywniej odzwierciedla całkowite zaawansowanie procesu zapalnego w ChLC. Stąd wykazana korelacja FL z GCDAS jest potwierdzeniem przydatności diagnostycznej badanego kopromarkera niezależnie od lokalizacji zmian chorobowych, u wszystkich chorych z ChLC.

Pomimo wskazanych powyżej mankamentów poszczególnych badań laboratoryjnych, nadal pełnią one ważną rolę w ocenie aktywności i zaawansowania ChLC. Proces zapalny toczy się w przewodzie pokarmowym, ale znajduje on także swe odzwierciedlenie ogólnoustrojowe poprzez stymulację syntezy szeregu markerów zapalnych, w tym tzw. białek ostrej fazy. Do parametrów o największej przydatności zalicza się CRP, fibrynogen, OB, ferrytynę czy D-dimery [99]. Co ciekawe, szczególnie czułym wykładnikiem nasilenia procesu zapalnego jest stężenie płytek krwi [107,108]. W niniejszej pracy wykazano dobrą korelację FL z takimi parametrami, jak CRP, fibrynogen, OB, stężenie leukocytów czy właśnie – stężenie płytek krwi. Taka zgodność w przeprowadzonej analizie statystycznej zdaje się jednoznacznie potwierdzać duży potencjał diagnostyczny FL, jako markera wiarygodnie odzwierciedlającego aktywność biochemiczną ChLC. Jest także potwierdzeniem obserwacji, poczynionych w dotychczas przeprowadzonych badaniach w tym zakresie [89,90,98,104].

Kolejnym aspektem, w którym należy przeanalizować przydatność FL w ocenie aktywności ChLC niezależnie od lokalizacji zmian chorobowych, jest aspekt czysto kliniczny. W celu oszacowania aktywności klinicznej ChLC od lat w zastosowaniu są różne skale, uwzględniające głównie nasilenie poszczególnych objawów i odchyłeń w badaniu przedmiotowym. Najbardziej popularną i szeroko stosowaną jest skala CDAI. Mankamentem każdej skali klinicznej – także CDAI - jest ryzyko błędnego oszacowania wynikające z subiektywnego przedstawienia natężenia objawów opisywanych przez pacjenta i/lub błędnego oszacowania natężenia objawów przez osobę przeprowadzającą wywiad lekarski. Dowodem

na to może być chociażby praca Lahif i wsp., w której wykazano, że wartość indeksu CDAI może być istotnie podwyższona także u chorych z IBS [109]. Dlatego też interpretacja CDAI powinna być zawsze dokonywana w kontekście wyników innych badań dodatkowych. Co ciekawe, w niniejszym badaniu wykazano pozytywną korelację między FL a CDAI w całej grupie badanej. Aby jednak przyjrzeć się temu zagadnieniu nieco szerzej, podzielono dodatkowo wszystkich chorych na podgrupy w zależności od aktywności klinicznej (Tabela 19) i porównano stężenia FL. Okazało się, że FL pozwalała na różnicowanie jedynie pomiędzy pacjentami z najcięższą klinicznie postacią ChLC a chorymi w remisji. Co więcej, taka konkluzja płynie jedynie z analizy, dotyczącej całej grupy badanej, a nie poszczególnych podgrup pacjentów (L1, L2 i L3). Być może obserwacja ta jest więc nieco przypadkowa. Reasumując wydaje się, że z dużym sceptycyzmem można uznać, iż FL w pewnym stopniu odzwierciedla aktywność kliniczną ChLC, ocenianą poprzez skalę CDAI, ale nie pozwala na odróżnienie umiarkowanego zaostrzenia od remisji czy ciężkiego rzutu ChLC. Biorąc jednak pod uwagę wszystkie omówione ograniczenia CDAI uprawniona jest hipoteza, że taka konkluzja nie umniejsza wartości diagnostycznej FL, tylko raczej jest kolejnym argumentem przeciwko powszechnemu stosowaniu indeksów klinicznych w ocenie aktywności ChLC. Oczywiście nie powinno to oznaczać całkowitej rezygnacji z użycia CDAI czy skali Harveya-Bradshawa, ale dążąc do obiektywnego oszacowania nasilenia procesu zapalnego i zaawansowania ChLC, skale te należy uznać za narzędzie drugoplanowe, pomocnicze. Innym ciekawym rozwiązaniem byłoby stworzenie nowych indeksów klinicznych, w których uwzględniono by dodatkowo pewne proste, wiarygodne markery aktywności ChLC, takie jak kopromarkery.

Kolejnym ciekawym wątkiem badawczym jest kwestia wpływu rozległości zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym na nasilenie objawów ChLC i wyniki badań dodatkowych, w tym także na wynik FL. Wydaje się bowiem, że na powyżej wskazane parametry powinna mieć wpływ nie tylko sama aktywność zapalenia, ale także stopień jego rozprzestrzenienia w przewodzie pokarmowym. Innymi słowy, należy przypuszczać, że chory z niewielką aktywnością zapalenia, ale dotyczącą znacznej części jelita cienkiego i grubego może mieć bardziej nasilone objawy i istotniejsze odchylenia w badaniach dodatkowych, niż inny pacjent, u którego ChLC dotyczy jedynie krótkiego odcinka jelita krętego lub grubego, nawet jeśli wykazuje znaczne zaawansowanie zmian zapalnych. Wydaje się również, że największy wpływ na nasilenie objawów klinicznych choroby, a także na odchylenia w badaniach dodatkowych mogą mieć zmiany zapalne w jelicie grubym, ewentualnie

współistniejące ze zmianami w dystalnym odcinku jelita krętego [89,110,111]. Powszechnie znany jest bowiem fakt, że postać L1 ChLC według klasyfikacji montrealskiej przebiega w sposób najmniej charakterystyczny i sprawia ona najwięcej trudności diagnostycznych. Próbę zweryfikowania tych ciekawych wątków podjęto w niniejszej pracy. Dzieląc całą grupę badaną na podgrupy w zależności od lokalizacji ChLC, porównano poszczególne parametry oceny aktywności choroby (Tabela 18). Wykazano, że stężenia FL były istotnie niższe wśród chorych z izolowanymi zmianami zapalnymi w jelicie cienkim zarówno w porównaniu z postacią L2, jak i L3. Jednocześnie w zakresie pozostałych parametrów (CRP i CDAI) różnice dotyczyły tylko postaci L1 i L3. Można więc przyjąć, że tak jak w odniesieniu do FC, stężenia FL mogą być niższe w przypadku izolowanych zmian zapalnych w jelicie cienkim po części w związku z samą lokalizacją choroby, niezależnie od faktycznej aktywności procesu zapalnego [89,111]. Oczywiście taka analiza jest obciążona błędem interpretacyjnym, ponieważ nie można wykluczyć, że w badanej grupie chorzy z izolowanymi zmianami w jelicie grubym oraz w jelicie grubym i cienkim po prostu ciężiej chorowali w porównaniu do pacjentów z podgrupy L1 i z tego wynikały zaobserwowane różnice. Wskazana jednak w niniejszej pracy tendencja do niższych wartości stężenia FL wśród chorych ze zmianami ograniczonymi do jelita cienkiego (L1) wydaje się wpisywać w obserwacje, poczynione w innych analizach. Sugerują one, że pomimo jednoznacznie wykazanej przydatności diagnostycznej kopromarkerów także w tej podgrupie pacjentów (L1), jest ona mniejsza niż w postaci L2 i L3 [111-114]. Potwierdzeniem tego mogą być obserwacje poczynione w niniejszej pracy po podzieleniu grupy badanej na poszczególne podgrupy w zależności od lokalizacji zmian chorobowych. Okazało się, że w przypadku postaci L1 badany kopromarker korelował jedynie z SEAS-CD. Wśród pacjentów z izolowanymi zmianami chorobowymi w jelicie grubym, oprócz CRP, odnotowano także istotną zależność między FL a aktywnością endoskopową oraz leukocytozą (graniczna istotność statystyczna korelacji z OB. i płytkami krwi). Największą przydatność diagnostyczną FL wydaje się mieć natomiast w przypadku chorych z równoczesnym zajęciem przez proces zapalny jelita cienkiego i grubego (L3), ponieważ tutaj FL wykazywała korelację z licznymi parametrami (CRP, CDAI, OB., SES-CD i GCDAS). W tym miejscu warto zaznaczyć, że także CRP wśród chorych z postacią L1 wykazuje zależność jedynie z fibrynogenem i płytkami krwi, podczas gdy u innych pacjentów tych zależności jest istotnie więcej.

Podsumowując tę część dyskusji należy zaznaczyć, że uzyskane wyniki potwierdzają postawioną powyżej tezę, że postać L1 ChLC jest najtrudniejszą postacią z diagnostycznego

punktu widzenia w związku z istotnymi ograniczeniami i mniejszą przydatnością badań dodatkowych, w tym FL. Podobnie więc jak w przypadku FC, także w odniesieniu do FL lokalizacja zmian chorobowych wydaje się mieć znaczenie dla wiarygodności omawianego badania. Jest to niezwykle ważne z praktycznego punktu widzenia, ponieważ w pewnym stopniu tłumaczy zaskakujące i niekiedy trudne do interpretacji wyniki badań kopromarkerów u poszczególnych pacjentów. Problem ten najlepiej znany jest w odniesieniu do FC. Parametr ten jest powszechnie uznanym badaniem w codziennej praktyce klinicznej i stanowi ważne i bardzo pomocne narzędzie, którego wprowadzenie istotnie poprawiło w ostatnich latach jakość opieki nad chorymi z NChZJ. Zdarzają się jednak niekiedy wyniki trudne do interpretacji, zwłaszcza gdy pacjent czuje się dobrze, pozostałe wyniki badań dodatkowych są prawidłowe, a wartość FC - istotnie podwyższona. Inną problematyczną sytuacją kliniczną jest ewidentna obecność aktywnych zmian zapalnych w jelicie cienkim (oceniana zwykle w badaniach obrazowych) przy względnie niskim stężeniu FC. Takie zaskakujące wyniki próbuje się tłumaczyć potencjalną zmiennością w wydalaniu kopromarkerów, zależną od pory dnia, w której pobrano stolec do badania czy na przykład pewnymi dotąd niezidentyfikowanymi cechami osobniczymi pacjentów [115-117]. Kolejnym możliwym czynnikiem, warunkującym niejednorodną przydatność kopromarkerów w diagnostyce NChZJ może być właśnie zasięg i lokalizacja zmian chorobowych.

Inną ciekawą obserwacją, związaną z zagadnieniem różnorodnej lokalizacji zmian zapalnych w ChLC i jej wpływem na przydatność oznaczania kopromarkerów jest hipoteza sygnalizowana już w dyskusji, że kluczowy wpływ na wartość stężeń FL może mieć obecność aktywnych zmian zapalnych w jelicie grubym. Pewnym odzwierciedleniem takiego stanu rzeczy jest omawiany już brak korelacji FL z aktywnością ChLC w zakresie jelita cienkiego ocenianą skalą SEAS-CD w całej grupie badanej przy jednoczesnej bardzo silnej dodatniej zależności między FL a zmianami endoskopowymi w jelicie grubym (*colonic* SES-CD) w tej samej populacji (Tabela 11). Taka konkluzja może być jednak również obarczona błędem, ponieważ stężenie kopromarkerów wydaje się zależeć w głównej mierze od zmian zapalnych w obrębie błony śluzowej, a w mniejszym stopniu od nasilenia procesu chorobowego w głębszych warstwach jelita. Z tego może wynikać lepsza korelacja FL z SES-CD, jako że to endoskopia – co omówiono we wcześniejszej części dyskusji - daje lepszą możliwość oceny zmian śluzówkowych niż MRE. Aby zweryfikować taką hipotezę należałoby porównać stężenia FL ze zmianami endoskopowymi w jelicie cienkim u chorych z postacią L1 ChLC. Danych na ten temat jest bardzo mało i zdają się jednak potwierdzać postawioną powyżej

teżę, że aktywność endoskopowa ChLC w jelicie cienkim słabiej koreluje z FL niż w innych lokalizacjach choroby. Co więcej, w pracy autorstwa Sipponen i wsp, korelacji między FL a SES-CD w zakresie jelita krętego nie wykazano wcale [97]. Według najlepszej wiedzy autorki, badanie to jest jedną z niewielu prób odpowiedzi na pytanie o przydatność oznaczania FL w postaci L1 ChLC w odniesieniu do aktywności endoskopowej. Taka analiza jest bowiem trudna do przeprowadzenia w ChLC. Wynika to z faktu, że wykonanie pełnej kolonoskopii z intubacją jelita cienkiego jest często niemożliwe chociażby ze względu na współistniejące u pacjentów z ChLC odmienności anatomiczne związane z przewężeniami, przetokami bądź też zmianami anatomii jelit po przebytych operacjach [97,118]. Odzwierciedleniem tej sytuacji może być odsetek pacjentów z zaintubowanym jelitem cienkim w czasie kolonoskopii w grupie badanej, który wynosił 69%. Pewnym rozwiązaniem byłoby szersze zastosowanie w takich sytuacjach klinicznych endoskopii kapsułkowej (CE - *ang.* capsule endoscopy). Kopylov i współpracownicy wykazali w przeglądzie danych literaturowych i meta-analizie, że FC dobrze odzwierciedla aktywność zmian zapalnych w jelicie cienkim w porównaniu do oceny metodą CE [119]. Nieco inne wnioski płyną jednak z pracy, pochodzącej z ośrodka badawczego w Trondheim w Norwegii, w której próbowano odpowiedzieć na bardziej ogólne pytanie, dotyczące przydatności FC w przewidywaniu rzeczywistej obecności zmian patologicznych w jelicie cienkim, potwierdzonych badaniem CE [120]. Autorzy stwierdzili, że jedynie zmiany o charakterze owrzodzeń i/lub nadżerek w jelicie cienkim powodują istotne zwiększenie stężenia FC. Zmiany bardziej subtelne, mniej nasilone w mniejszym stopniu wpływają na zwiększenie tych wartości i prawdopodobnie właśnie chorych z tego typu zmianami dotyczy mniejsza przydatność kopromarkerów w prognozowaniu rzeczywistej obecności zmian zapalnych w tej części przewodu pokarmowego. Niemniej jednak wykazano, że im wyższe stężenie FC, tym większe prawdopodobieństwo odnalezienia patologii w badaniu CE w jelicie cienkim. W tym miejscu warto jednak podkreślić, że szersze zastosowanie CE w detekcji zmian zapalnych w jelicie cienkim ogranicza ryzyko powikłań, związane z częstym występowaniem zwężeń w przewodzie pokarmowym u chorych z ChLC, które mogą doprowadzić do uwięźnięcia kapsułki, co zazwyczaj skutkuje koniecznością podjęcia interwencji chirurgicznej. Stąd też zastosowanie kopromarkerów u pacjentów z ChLC ze zmianami zapalnymi w jelicie cienkim nadal jest uzasadnione, pomimo wskazanych powyżej pewnych ograniczeń i wątpliwości.

Innym możliwym wytłumaczeniem wyższego stężenia FL wśród chorych ze zmianami w jelicie grubym może być także większa aktywność zmian zapalnych ocenianych

histopatologicznie. Dysponujemy bowiem danymi sugerującymi, że to właśnie nasilenie i charakter nacieku zapalnego w ścianie przewodu pokarmowego jest ważnym czynnikiem decydującym o wartości FL [97,102,121,122]. Nie można jednak zweryfikować takiej hipotezy w niniejszej pracy, ponieważ nie dysponujemy danymi, dotyczącymi aktywności zmian histopatologicznych w grupie badanej.

Kolejnym ważnym zagadnieniem, odnoszącym się do całej grupy badanej, jest kwestia przydatności FL w odróżnianiu aktywnej od nieaktywnej postaci ChLC. Danych w tym zakresie w odniesieniu do FL jest bardzo niewiele, w przeciwieństwie do znacznie lepiej zbadanego kopromarkera – FC [61-73,90,94,97,100,104,107,123,124]. Uwzględniając pozytywną korelację stężenia FL ze stężeniem FC w całej grupie badanej (Rycina 3), możemy upatrywać podobnego zastosowania dla FL, jak zostało to wykazane dotychczas dla FC. W jednej z największych analiz wykazano, że stężenie FC równe 274 $\mu\text{g/g}$ (przy zastosowaniu do oznaczania FC metody immunoenzymatycznej ELISA) ma największą czułość i swoistość w różnicowaniu remisji i aktywnej ChLC, z wartością AUC równą 0,935 [124]. Warto zaznaczyć, że punktem odniesienia w tym badaniu była aktywność endoskopowa. Autorzy tej pracy przyjęli, że o aktywnej postaci ChLC świadczy wartość indeksu CDEIS ≥ 3 pkt. Podobne wyniki uzyskali D’Haens i wsp., którzy w swojej pracy za jedną z definicji nieaktywnej ChLC (remisji) przyjęli wartość CDEIS ≤ 3 pkt. Autorzy ci wykazali, że stężenia FC $\leq 250 \mu\text{g/g}$ z 94% czułością i 62% swoistością wskazują na remisję ChLC (PPV 48,5%, NPV 96,6%) [125]. Tak więc na tych przykładach widać, że kluczowe znaczenie dla ostatecznej oceny ma właśnie kwestia zdefiniowania punktu odniesienia, czyli tzw. złotego standardu diagnostycznego, różnicującego aktywną od nieaktywnej postaci ChLC. Biorąc pod uwagę fakt, że za taki złoty standard uznaje się endoskopię, także w niniejszej analizie odniesiono się do nasilenia zmian, stwierdzanych podczas kolonoskopii. W ocenianej grupie badanej za aktywną postać choroby uznano sytuację, w której wartość *colonic* SES-CD wynosiła powyżej 3 punktów i dokonano analizy celem wskazania optymalnego punktu odcięcia wartości FL. Oceny tej dokonano u 51 pacjentów z lokalizacją choroby wg klasyfikacji montrealskiej L2 oraz L3, u których przeprowadzono kolonoskopię z oceną całego jelita grubego. Wykazano, że stężenie FL równe 145,82 $\mu\text{g/ml}$ miało największą, istotną statystycznie przydatność diagnostyczną i charakteryzowało się 84,62% czułością oraz 60,53% swoistością w różnicowaniu pacjentów w stanie remisji od pacjentów z obecnymi aktywnymi zmianami endoskopowymi w jelicie grubym. Test ten charakteryzował się pozytywną wartością predykcyjną (PPV) rzędu 42,3%, natomiast negatywna wartość

predykcja (NPV) wyniosła 92%. Dodatkowo, aby oszacować przydatność prognostyczną stężenia FL w ocenie zmian endoskopowych, wykonano analizę regresji wielorakiej, która także potwierdziła znamienne istotność FL w prognozowaniu aktywności endoskopowej ChLC, a więc tym samym potwierdzono przydatność FL w ocenie aktywności ChLC w jelicie grubym. Podobne wartości stężenia FL w przewidywaniu obecności aktywnych zmian endoskopowych w przewodzie pokarmowym wskazał zespół Yamamoto, z tym że praca ta dotyczyła pacjentów z ChLC po leczeniu operacyjnym [126]. Autorzy wykazali, że wartość 125 $\mu\text{g/g}$ cechuje się 70% czułością i 60% swoistością, a PPV i NPV wynoszą odpowiednio 64% i 67%. Natomiast stężenie FL równe 140 $\mu\text{g/g}$ najlepiej prognozowało kliniczne zaostrzenie ChLC w ciągu 12 miesięcy obserwacji po leczeniu chirurgicznym.

Pewne kontrowersje może budzić przyjęty w powyższej analizie punkt odcięcia, definiujący aktywną i nieaktywną endoskopowo postać ChLC. Kontrowersje te – jak wykazano powyżej – dotyczą jednak nie tylko niniejszej pracy, ale także innych badań, które były poświęcone temu zagadnieniu. Jak wiadomo bowiem, za cel terapeutyczny w obecnie uznanym standardzie leczenia ChLC uznaje się wygojenie błony śluzowej (MH- *ang.* mucosal healing) i można byłoby się spodziewać, że definicja MH powinna odnosić się do sytuacji całkowitego braku zmian patologicznych w badaniu endoskopowym [31]. Okazuje się jednak, że kwestia ta jest o wiele bardziej złożona, co więcej według niektórych źródeł w ocenie MH należy uwzględnić nie tylko endoskopię, ale także ocenę histologiczną. Warto więc podkreślić, że brak jest jak na razie jednolitych wytycznych dotyczących definicji zarówno remisji endoskopowej, jak i histologicznej. Rozbieżności te wynikają m.in. z używania różnych skal oceniających aktywność choroby oraz przyjmowania innych założeń, co do szacowania remisji [44,45,127]. Najczęstszymi skalami wykorzystywanymi w ocenie endoskopowej są skale CDEIS, SES-CD oraz skala Rutgeerts'a, która odnosi się do pacjentów po zabiegach resekcyjnych przewodu pokarmowego, poddawanych kolonoskopii w celu oceny wznowy ChLC po operacji [44,45,127]. Część autorów za remisję endoskopową przyjmuje zupełny brak owrzodzeń, nadżerek oraz jakichkolwiek zmian zapalnych, czego wyrazem jest wartość 0 punktów w skalach oceny endoskopowej. Natomiast liczna grupa badaczy przy ocenie remisji endoskopowej uznaje obecność niewielkich zmian zapalnych w postaci rumienia, pojedynczych nadżerek czy zatarcia siatki naczyniowej za dopuszczalną, ponieważ korzystając z niezwykle nowoczesnej i bardzo czulej aparatury endoskopowej gastroenterologów są w stanie u większości chorych w pełnym dobrostanie klinicznym uwidocznili obecność dyskretnych zmian zapalnych, które nie wydają się mieć istotnego

negatywnego znaczenia prognostycznego dla tych pacjentów. Punkty odcięcia dla przykładowych skal endoskopowych mające świadczyć o remisji endoskopowej wynoszą np. w skali SES CD ≤ 3 lub <3 punktów. Podobnie - w skali CDEIS przyjmuje się wartości $<$ lub ≤ 3 , a nawet < 5 punktów [44,45,127-130]. W mojej pracy również oceniano aktywność endoskopową. Mając na uwadze powyższe rozbieżności, co do endoskopowej oceny remisji, po przestudiowaniu literatury użyto skali SES-CD, której zastosowanie w codziennej praktyce jest prostsze niż skali CDEIS, a jej wartość kliniczna jest porównywalna do skali CDEIS [128,131]. Za remisję przyjęto – jak omówiono powyżej - wartość SES-CD ≤ 3 punktów, podobnie jak było to w opublikowanych do tej pory pracach naukowych [44,97,127,128].

Tak jak jednak wspomniano na początku, ocena endoskopowa – pozostając złotym standardem ewaluacji aktywności ChLC – obarczona jest ryzykiem popełnienia błędu niedoszacowania zaawansowania zmian zapalnych w zakresie jelita cienkiego, które jest poza zasięgiem rutynowej diagnostyki endoskopowej. Dlatego też w niniejszej pracy przeprowadzono dodatkową analizę, uwzględniając indeks GCDAS, który łączy ocenę jelita grubego w kolonoskopii (*colonic* SES-CD) i jelita cienkiego w MRE (SEAS-CD). Tak więc analiza ta dała możliwość zbiorczego uwzględnienia heterogenności lokalizacji zmian chorobowych w ChLC. Wykreślona krzywa ROC dla powyżej określonego GCDAS określiła optymalny punkt odcięcia dla stężenia FL na poziomie 187,75 $\mu\text{g/ml}$. AUC wynosiło 0,671 ($p=0,0285$). Stężenie to charakteryzowało się 88,89% czułością oraz 41,38% swoistością dla różnicowania pacjentów w stanie remisji od pacjentów z aktywną ChLC. Test ten charakteryzował się pozytywną wartością predykcyjną (PPV) rzędu 32%, natomiast negatywna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 92%. Stanowi to kolejny dowód na przydatność oznaczania FL w odróżnianiu aktywnej od nieaktywnej postaci ChLC, także uwzględniając heterogenną lokalizację zmian zapalnych w tej chorobie.

Wyniki cytowanych badań oraz wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na kilka potencjalnych praktycznych konkluzji. Przede wszystkim FL jest parametrem bardzo czułym i nawet przy niewielkiej aktywności zapalnej może wykazywać podwyższone stężenie. Z drugiej jednak strony wysokie wartości NPV sugerują, że niewykazanie nieprawidłowych stężeń FL jest wiarygodnym dowodem na brak aktywnej postaci ChLC. Zwłaszcza ta druga konkluzja jest ważna z praktycznego punktu widzenia. Pacjenci z ChLC są bowiem wielokrotnie w swoim życiu poddawani diagnostyce endoskopowej, która wymaga odpowiedniego przygotowania, jest dość kosztowna i inwazyjna. Nie zawsze jednak

pojawienie się bólów brzucha czy nawet luźnych stolców u chorego z ChLC musi oznaczać rzeczywiste zaostrzenie choroby. Czasem przyczyną może być np. współistnienie objawów czynnościowych, co przez niektórych jest nawet interpretowane jako zespół nakładania IBS na zaburzenia organiczne [133,134]. I właśnie w takich sytuacjach oznaczenie FL mogłoby być szczególnie przydatne, ponieważ uzyskanie ujemnego wyniku tego kopromarkera (podobne obserwacje można odnieść do FC) powinno skłonić klinicystę do odstąpienia od diagnostyki endoskopowej. Natomiast podwyższone stężenie FL wymaga dalszych badań, w tym – oprócz weryfikacji endoskopowej – także m.in. różnicowania z nakładaniem się potencjalnych przyczyn infekcyjnych. Inną sytuacją kliniczną, w której oznaczanie FL mogłoby być przydatne, jest monitorowanie przebiegu ChLC w czasie remisji klinicznej, która jak wiemy nie zawsze oznacza tzw. remisję śluzówkową (ocenianą endoskopowo). Wykazanie podwyższonego stężenia FL u takiego pacjenta powinno skutkować poszerzeniem diagnostyki w celu ewentualnego wczesnego potwierdzenia aktywnych zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym jeszcze przed pełnoobjawowym zaostrzeniem. Dałoby to szansę na wdrożenie odpowiedniego leczenia, co mogłoby zapobiec pogorszeniu się stanu klinicznego chorego.

Podsumowanie dyskusji

Niniejsza praca w sposób jednoznaczny wskazuje na możliwość praktycznego zastosowania FL w rutynowej diagnostyce ChLC. Parametr ten wykazuje dużą przydatność diagnostyczną, niezależnie od lokalizacji zmian chorobowych w przewodzie pokarmowym. Wskazano jednocześnie na pewne ograniczenia i nieco mniejszą wiarygodność w odzwierciedlaniu nasilenia zmian zapalnych u chorych z postacią L1 według klasyfikacji montrealskiej. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że grupa chorych z izolowanymi zmianami chorobowymi w jelicie cienkim stanowi niezwykle trudne wyzwanie z diagnostycznego punktu widzenia. Wiąże się to z faktem, że rutynowe zastosowanie złotego standardu, jaki stanowi endoskopia nie jest możliwe, powszechne wdrażanie nowoczesnego obrazowania z wykorzystaniem enterografii/enteroklyzy rezonansu magnetycznego generuje znaczne koszty, a pozostałe badania laboratoryjne są mało precyzyjne w ocenie aktywności ChLC z lokalizacją w jelicie cienkim. Dlatego też wydaje się, że także wśród chorych z postacią L1 ChLC zastosowanie kopromarkerów, w tym FL, jest w pełni uzasadnione.

Praca ta ma oczywiście szereg ograniczeń, część z nich została już uprzednio omówiona. Przykładem może być fakt jednokrotnego oznaczania FL u danego pacjenta, co może budzić pewne kontrowersje w związku z doniesieniami na temat FC, które wskazują na pewną dobową zmienność w stężeniu tego kopromarkera [115-117]. Jak dotąd nie dysponujemy jednak danymi potwierdzającymi podobne obserwacje w odniesieniu do FL. Poza tym konieczność wielokrotnego oznaczania danego kopromarkera u jednego chorego podważałaby jedną z największych zalet tego rodzaju diagnostyki, czyli prostotę i niskie koszty. W niniejszej pracy jednoznacznie wykazano przydatność jednorazowego pomiaru FL, tak więc mnożenie liczby pomiarów wydawało się być nieuzasadnione. Dlatego też wydaje się, że omówione potencjalne ograniczenia przeprowadzonych analiz nie umniejszają istotnie znaczenia wniosków, które sformułowano w niniejszej pracy.

6. WNIOSKI

- FL jest przydatnym markerem diagnostycznym, który dobrze odzwierciedla aktywność kliniczną ChLC, ocenianą indeksem CDAI, a także koreluje istotnie z biochemicznymi parametrami stanu zapalnego, jak CRP, niezależnie od lokalizacji zmian chorobowych.
- FL dobrze odzwierciedla nasilenie zmian chorobowych, ocenianych endoskopowo, u pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian zapalnych w jelicie grubym i może być rozpatrywana jako dobry, nieinwazyjny marker zastępczy, odzwierciedlający aktywność endoskopową ChLC.
- FL wiarygodnie odzwierciedla aktywność ChLC u pacjentów z izolowaną lokalizacją zmian chorobowych w jelicie cienkim w odniesieniu do oceny nasilenia procesu zapalnego w tej części przewodu pokarmowego w MRE, chociaż badanie to ma także pewne ograniczenia w tej podgrupie chorych.
- U pacjentów z ChLC z lokalizacją choroby zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym, FL może być przydatnym badaniem diagnostycznym, ponieważ dobrze odzwierciedla aktywność ChLC, ocenianą równolegle metodami endoskopowymi i radiologicznymi (MRE). W tej podgrupie chorych FL wydaje się cechować największą przydatnością diagnostyczną.
- Badanie FL pozwala na nieinwazyjne różnicowanie remisji od aktywnej postaci ChLC w ocenie endoskopowej, a za stężenie graniczne o największej przydatności diagnostycznej można uznać wartość 146 µg/ml.

7. STRESZCZENIE

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) stanowią coraz większy problem medyczny. W ostatnich latach obserwuje się zwiększoną zapadalność na te jednostki chorobowe. Jednak mimo stałego postępu w medycynie i immunologii, wciąż nie zidentyfikowano jednoznacznego czynnika etiologicznego NChZJ. Skutkiem tego jest fakt, że dostępne leczenie ma charakter objawowy, a jego głównym celem jest jedynie zmniejszenie aktywności choroby i ograniczenie jej progresji, natomiast wyleczenie nie jest możliwe. NChZJ, a zwłaszcza choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC), stanowi także duże wyzwanie diagnostyczne. Choroba ta charakteryzuje się bowiem obecnością zmian zapalnych obejmujących całą grubość ściany przewodu pokarmowego z możliwością lokalizacji w każdym odcinku przewodu pokarmowego. Typowa dla tej jednostki jest nieciągłość zmian oraz występowanie głębokich owrzodzeń z tendencją do tworzenia przetok światła przewodu pokarmowego oraz przetok. W zależności od lokalizacji choroby, pacjenci zgłaszają odmienne dolegliwości podmiotowe. Wachlarz zgłaszanych objawów jest szeroki, od ogólnych jak chudnięcie, utrata apetytu, stany podgorączkowe, po bardziej sprecyzowane dolegliwości jak dysfagia, wymioty, bóle brzucha czy biegunka. W diagnostyce ChLC do dyspozycji pozostaje wiele badań, począwszy od badania przedmiotowego i oceny za pomocą skal aktywności klinicznej choroby, której przykładem jest skala CDAI (*ang.* Crohn's Disease Activity Index), poprzez badania biochemiczne, obrazowe oraz badania endoskopowe z pobraniem materiału do oceny histopatologicznej. Obecnie złotym standardem diagnostycznym pozostaje ileokolonoskopia z pobraniem wycinków do badania histopatologicznego, choć coraz większe znaczenie w panelu diagnostycznym zdobywa enterografia rezonansu magnetycznego (*ang.* magnetic resonance enterography – MRE). Proces diagnostyczny jest czasochłonny, obciążający dla pacjenta oraz dla systemów opieki zdrowotnej. Dlatego też poszukuje się nowych, mniej inwazyjnych metod diagnostycznych. Takie zastosowanie upatruje się w wykorzystaniu w diagnostyce NChZJ kopromarkerów, czyli białek stanu zapalnego oznaczanych w kale. Do codziennej praktyki zostało już wprowadzone oznaczanie kalprotektyny (*ang.* fecal calprotectin – FC). Podobnego zastosowania upatruję się w oznaczaniu laktoferyny w stolcu (*ang.* fecal lactoferrin – FL).

Celem pracy było wykazanie przydatności oznaczania FL w ocenie aktywności ChLC. Grupę badawczą stanowiło 101 pacjentów z potwierdzoną ChLC, hospitalizowanych w

Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. U pacjentów dokonano pomiaru aktywności biochemicznej choroby poprzez oznaczenie morfologii krwi obwodowej z rozmazem, białka C-reaktywnego (CRP), odczynu Biernackiego (OB.) oraz fibrynogenu. Oznaczono także stężenie FC. Aktywność kliniczną choroby oceniono za pomocą skali CDAI. Lokalizację zmian chorobowych oraz aktywność zmian zapalnych oceniano za pomocą ileokolonoskopii, posługując się skalą SES-CD (*ang.* Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) oraz za pomocą MRE, posługując się skalą SEAS-CD (*ang.* Simple Enterographic Activity Score for Crohn's Disease). U chorych ze zmianami zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym posłużono się skalą GCDAS (*ang.* Global Crohn's Disease Activity Score), która jednocześnie uwzględniała ocenę aktywności w MRE (jelito cienkie) i endoskopii (jelito grube). U każdego chorego dokonano pomiaru stężenia FL w oddanej próbce stolca za pomocą metod immunoenzymatycznych. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

W zależności od lokalizacji zmian chorobowych, pacjentów dodatkowo podzielono na 3 podgrupy. Najbardziej liczne grupy stanowili pacjenci z lokalizacją w obrębie jelita cienkiego (L1 wg klasyfikacji montrealskiej - 39 pacjentów) oraz pacjenci z lokalizacją zmian chorobowych zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym (L3 - 38 pacjentów). U 24 pacjentów choroba dotyczyła wyłącznie jelita grubego (L2).

Wykazano istotną statystycznie korelację FL z CRP, zarówno dla całej grupy badanej, jak i poszczególnych podgrup. Dodatkowo w całej grupie badanej stężenie FL korelowało m.in. z CDAI, *colonic* SES-CD oraz GCDAS, a także z FC. Dla chorych ze zmianami w obrębie jelita grubego, u których przeprowadzono pełną ileokolonoskopię (łącznie 51 chorych z lokalizacją choroby L2 oraz L3) wykonano analizę ROC (*ang.* receiver operating characteristic curve). Zakładając endoskopową remisję w jelicie grubym przy wartości *colonic* SES-CD ≤ 3 punktów, wykreślono krzywą ROC (wykres nr 1), poszukując optymalnego punktu odcięcia dla stężenia FL, różnicującego remisję od aktywnej postaci ChLC ze zmianami w obrębie jelita grubego. AUC wynosiło 0,676 ($p=0.0347$) (95% CI: 0,531-0,8). Optymalny punkt odcięcia dla stężenia FL w kale wynosił 145,82 $\mu\text{g/ml}$. Stężenie to charakteryzowało się 84,62% czułością oraz 60,53% swoistością w różnicowaniu pacjentów w stanie remisji od pacjentów w fazie zaostrzenia z obecnymi zmianami endoskopowymi w jelicie grubym. Test ten charakteryzował się pozytywną wartością

predykcyjną (PPV) rzędu 42,3 %, natomiast negatywna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 92 %.

W podgrupie pacjentów z lokalizacją zmian wyłącznie w obrębie jelita cienkiego FL korelowała istotnie statystycznie z CRP oraz aktywnością choroby wyrażoną skalą enterograficzną SEAS-CD. Natomiast w podgrupie chorych z lokalizacją zmian tylko w jelicie grubym wykazano, podobnie jak w poprzednich grupach, korelacje FL z CRP, WBC oraz *colonic* SES-CD. W grupie pacjentów ze zmianami zlokalizowanymi zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym (L3) wykazano korelacje FL z CRP, CDAI, OB., Hgb oraz *colonic* SES-CD i GCDAS. Najwyższe średnie stężenie FL oraz CRP wykazano w podgrupie L2, natomiast najwyższą aktywność kliniczną wyrażoną indeksem CDAI zgłaszali pacjenci w podgrupie L3.

W niniejszej pracy wykazano przydatność oznaczania FL w ocenie aktywności ChLC. Przydatność ta odnosi się do wszystkich pacjentów z ChLC, niezależnie od lokalizacji, choć bezwzględne wartości stężeń najbardziej wyrażone są u pacjentów z lokalizacją zmian w obrębie jelita grubego oraz grupie pacjentów z lokalizacją zmian zarówno w jelicie grubym, jak i cienkim. Podobnie, w postaci z zajęciem zarówno jelita cienkiego i grubego FL koreluje z największą liczbą pozostałych parametrów, oceniających aktywność ChLC. Stąd wydaje się, że przydatność FL w ocenie aktywności ChLC jest największa w tej podgrupie pacjentów. Oznaczanie FL, będącej wyjątkowo stabilnym biochemicznie markerem, łatwym w uzyskaniu, niedrogim i nieobciążającym dla pacjenta, może stanowić jedną z pomocnych i wiarygodnych metod do oceny aktywności ChLC.

8. SUMMARY

Inflammatory bowel diseases are an increasing medical problem. However, despite the development of medicine, there is still no unequivocal etiological factor triggering the development of inflammatory bowel diseases, and the available treatment is a symptomatic one aimed at reducing the activity of the disease and limiting its progression. The diagnosis itself is problematic.

Crohn's disease is characterized by the presence of inflammatory lesions including the entire thickness of the gastrointestinal wall with the possibility of locations in each section of the gastrointestinal tract. The discontinuity of lesions, the occurrence of deep ulcers and the tendency to create strictures of the gastrointestinal tract and fistulas are typical for this entity. Depending on the location of the lesions, patients report different symptoms. The range of reported symptoms is wide, from general ones such as weight loss, loss of appetite, fever, to more specific complaints such as dysphagia, vomiting, abdominal pain or diarrhea. In Crohn's disease diagnostics there are many available tests, ranging from physical examination and assessment using the scale of clinical activity of the disease, exemplified by the scale of CDAI (Crohn's Disease Activity Index), and also biochemical, imaging, endoscopic and histological examination. Currently, the gold standard of diagnosis is the ileocolonoscopy with the collection of histopathologic specimens, although MRE (magnetic resonance enterography) is becoming more and more important in the diagnostic panel. The diagnostic process is time-consuming, burdensome for the patient and for the health care system. That is why we are looking for new, less invasive diagnostic methods.

This application is seen in the use of copromarkers in the diagnosis of inflammatory bowel diseases. FC (fecal calprotectin) has already been introduced for daily practice in order to differentiate patients with inflammatory bowel disease from patients with irritable bowel syndrome and the initial assessment of disease activity. A similar application could be seen in the FL (fecal lactoferrin) measurement.

The aim of the study was to demonstrate the usefulness of FL in the evaluation of Crohn's disease activity. The study group consisted of 101 patients with confirmed Crohn's disease hospitalized in the Department of Gastroenterology, Dietetics and Internal Diseases at Poznan University of Medical Sciences.

Blood and fecal sample was taken from each patient and several biochemical parameters were measured (complete blood count, CRP – C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fibrinogen, FC). The clinical activity of the disease was assessed using CDAI. The location of lesions and the activity of inflammatory lesions were assessed by means of the ileocolonoscopy expressed in the SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) and MRE scale described in the SEAS-CD (Simple Enterographic Activity Score for Crohn's Disease) scale. In patients with lesions in both the small and large intestine, GCDAS (Global Crohn's Disease Activity Score) was calculated. In each patient the FL concentration in a given stool sample was measured using immunoenzymatic methods. Statistical analysis of the results was performed.

Depending on the location of the lesions, patients were further divided into 3 subgroups. The most numerous groups were patients with location within the small intestine (39 patients) and patients with location of lesions in both small and large intestine (38 patients). There were 24 patients with the location of lesions only within the large intestine.

A statistically significant correlation between FL and CRP was found for both the entire study group and individual subgroups. In addition, in the entire study group the concentration of FL correlated, among others, with CDAI, *colonic* SES-CD, GCDAS and FC. The ROC (receiver operating characteristic curve) analysis was performed for patients with colon lesions undergoing full ileocolonoscopy (in total 51 patients with disease location L2 and L3). Assuming endoscopic remission in colon at the *colonic* SES-CD ≤ 3 points, the ROC curve was plotted (graph 1) searching for the optimal cut-off point for FL concentration differentiating the remission from the active form of Crohn's disease with active inflammatory lesions in the large intestine. The AUC was 0.676 ($p = 0.0347$) (95% CI: 0.531-0.8). The optimal cut-off point for fecal FL concentration was 145.82 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The concentration was characterized by 84.62% sensitivity and 60.53% specificity for the differentiation of patients in remission from patients during exacerbation with the current endoscopic lesions in the large intestine. This test was characterized by a positive predictive value (PPV) of 42.3%, whereas the negative predictive value (NPV) was 92%.

In the subgroup of patients with location of lesions only in the small intestine, FL significantly correlated statistically with CRP, and disease activity expressed by the SEAS-CD enterographic scale. In contrast, in the subgroup of patients with location of lesions only in the large intestine, correlations between FL and CRP, WBC and *colonic* SES-CD were

shown similarly to previous groups. In the group of patients with lesions located both in the small and large intestine, LF correlations with CRP, CDAI, erythrocyte sedimentation rate, Hgb and *colonic* SES-CD, GCDAS were demonstrated. The highest average FL and CRP concentrations were demonstrated in the L2 subgroup, while the highest clinical activity expressed in the CDAI was reported by the patients in the L3 subgroup.

The usefulness of FL in assessment of Crohn's disease activity was shown in this study. The diagnostic value of this study seems to be useful in all patients with Crohn's disease, regardless of location, although the absolute values of concentrations are most expressed in patients with location of lesions in the large intestine and the group of patients with location of lesions in both large and small intestine. Moreover, in the L3 subgroup, FL correlated with the vast majority of other parameters, assessing disease activity. That it why it can be hypothesized, that clinical utility of FL measurement is the highest in patients with ileocolonic Crohn's disease location. FL as an exceptionally biochemically stable marker, easy to obtain, an inexpensive and non-invasive diagnostic marker, can be one of the methods for initial diagnosis of patients with suspicion of inflammatory bowel diseases and for the assessment of Crohn's disease activity.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Aniwan S, Park SH, Loftus EV Jr. Epidemiology, Natural History, and Risk Stratification of Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017 Sep;46(3):463-480.
2. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol.* 2001 Apr;7(2):175-84.
3. Bartnik W. Inflammatory bowel disease--Polish contribution. *J Physiol Pharmacol.* 2003 Dec;54 Suppl 3:205-10.
4. Witanowska A, Rydzewska G: Epidemiologia i przebieg kliniczny choroby Leśniowskiego-Crohna. In: *Choroba Leśniowskiego-Crohna- 100 lat diagnostyki i terapii.* Eds.: Rydzewska G, Małecka-Panas E, Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2008, It ed., 23-44.
5. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet.* 2018 Dec 23;390(10114):2769-2778.
6. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012 Jan;142(1):46-54.
7. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol.* 2005 May 7;11(17):2630-3
8. Rejestr Choroby Leśniowskiego-Crohna. <http://www.chorobacrohna.pl/aktualne-dane-2/>
9. Karolewska-Bochenek K, Lazowska-Przeorek I, Albrecht P, Grzybowska K, Ryzko J, Szamotulska K, Radzikowski A, Landowski P, Krzesiek E, Ignys I, Fyderek K, Czerwionka-Szaflarska M, Jarocka-Cyrta E. Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland. A prospective, population-based, 2-year study, 2002-2004. *Digestion.* 2009;79(2):121-9.

10. Skrzydło-Radomańska B, Radwan P, Radwan-Kwiatek K. Retrospective analysis of hospital admissions of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease from semi-rural and rural regions in the Department of Gastroenterology in Lublin between 2000- 2006. *Ann Agric Environ Med.* 2008;15(2):193-7.
11. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012 Nov 3;380(9853):1590-605.
12. Feuerstein JD, Cheifetz AS, Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin Proc.* 2017 Jul;92(7):1088-1103.
13. Maaser C, Langholz E, Gordon H, Burisch J, Ellul P, Ramirez VH, Karakan T, Katsanos KH, Krustins E, Levine A, Mantzaris GJ, O'Morain C, Strid H, Yuksel ES, Annesse V5European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Environmental Factors in IBD. *J Crohns Colitis.* 2017 Aug 1;11
14. L. Jakubowska-Burek, M. Skrzypczak-Zielińska, R. Słomski, A. Dobrowolska. Podłoże genetyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. Adamski Z, Linke K, Samborski W. Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii u dorosłych i dzieci, Termedia, Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2015, 227-242.
15. Jakubowska-Burek L, Kaczmarek E, Hoppe-Golebiewska J, Kaczmarek-Rys M, Hryhorowicz Sz, Kucharski MA, Słomski R, Linke K, Dobrowolska-Zachwieja A. Genotyping of CARD15/NOD2, ATG16L1 and IL23R Genes in Polish Crohn's Disease (CD) Patients – Are They Related to the Localization of the Disease and Extra-Intestinal Symptoms? *Crohn's Disease*, Dr. Sami Karoui (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/29880.
16. Uniken Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol.* 2017 Jan;241(2):146-158.
17. Dobrowolska-Zachwieja A., Linke K., Jakubowska-Burek L., Kucharski M. Genetic background of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Pol.* 16(6):421-426
18. de Bruyn M, Vermeire S. NOD2 and bacterial recognition as therapeutic targets for Crohn's disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2017 Dec;21(12):1123-1139.
19. Øyri SF, Müzes G, Sipos F. Dysbiotic gut microbiome: A key element of Crohn's disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015 Dec;43:36-49.

20. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 7;20(5):1192-210.
21. Carrière J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 14;20(34):12102-17.
22. Basso PJ, Fonseca MT, Bonfá G, Alves VB, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso CR. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Sep;47(9):727-37.
23. Ramos GP, Faubion WA, Papadakis KA. Targeting Specific Immunologic Pathways in Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017 Sep;46(3):577-588.
24. Giuffrida P, Corazza GR, Di Sabatino A. Old and New Lymphocyte Players in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis and Sci*. 2017 Dec 23. doi: 10.1007/s10620-017-4892-4.
25. Xu XR, Liu CQ, Feng BS, Liu ZJ. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 28;20(12):3255-64.
26. Olpin JD, Sjoberg BP, Stilwill SE, Jensen LE, Rezvani M, Shaaban AM. Beyond the Bowel: Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Radiographics*. 2017 Jul-Aug;37(4):1135-1160
27. Brown SR, Coviello LC. Extraintestinal Manifestations Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Sur Clin North Am*. 2015 Dec;95(6):1245-59
28. Witanowska A, Rydzewska G: Epidemiologia i przebieg kliniczny choroby Leśniowskiego-Crohna. In: *Choroba Leśniowskiego-Crohna- 100 lat diagnostyki i terapii*. Eds.: Rydzewska G, Małecka-Panas E, Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2008, It ed., 51-72.
29. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006 Mar;55(3):426-31.

30. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Aug;11(8):707-12
31. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017 Jan;11(1):3-25.
32. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, Adamina M, Ardizzone S, Buskens CJ, Sebastian S, Laureti S, Sampietro GM, Vucelic B, van der Woude CJ, Barreiro-de Acosta M, Maaser C, Portela F, Vavricka SR, Gomollón F; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis*. 2017 Feb;11(2):135-149.
33. Rieder F, Latella G, Magro F, Yuksel ES, Higgins PD, Di Sabatino A, de Bruyn JR, Rimola J, Brito J, Bettenworth D, van Assche G, Bemelman W, d'Hoore A, Pellino G, Dignass AU. European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Prediction, Diagnosis and Management of Fibrostenosing Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Aug;10(8):873-85.
34. Greenup AJ, Bressler B, Rosenfeld G. Medical Imaging in Small Bowel Crohn's Disease- Computer Tomography Enterography, Magnetic Resonance Enterography, and Ultrasound: "Which One Is the Best for What?". *Inflamm Bowel Dis*. 2016 May;22(5):1246-61.
35. Novak G, Parker CE, Pai RK, MacDonald JK, Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Jairath V, Khanna R. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jul 21;7:CD012351.
36. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterol*. 1976 Mar;70(3):439-44.

37. Sauer BG, Behm B. Metody stopniowania i klasyfikacji nieswoistych chorób zapalnych jelit. W: Nieswoiste zapalenia jelit. Bickston SJ, Bloomfeld RS (red.) Wydawnictwo ELSEVIER Urban&Partner 2013: 32-41.
38. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991 May;12(4):439-47.
39. Turner D, Levine A, Walters TD, Focht G, Otley A, López VN, Koletzko S, Baldassano R, Mack D, Hyams J, Griffiths AM. Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Feb;64(2):254-260.
40. Yoshida EM. The Crohn's Disease Activity Index, its derivatives and the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a review of instruments to assess Crohn's disease. *Can J Gastroenterol.* 1999 Jan-Feb;13(1):65-73.
41. Rimola J, Alvarez-Cofiño A, Pérez-Jeldres T, Ayuso C, Alfaro I, Rodríguez S, Ricart E, Ordás I, Panés J. Comparison of three magnetic resonance enterography indices for grading activity in Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2017 May;52(5):585-593.
42. Kim JS, Jang HY, Park SH, Kim KJ, Han K, Yang SK, Ye BD, Park SH, Lee JS, Kim HJ. MR Enterography Assessment of Bowel Inflammation Severity in Crohn Disease Using the MR Index of Activity Score: Modifying Roles of DWI and Effects of Contrast Phases. *AJR Am J Roentgenol.* 2017 May;208(5):1022-1029.
43. Eder P, Katulska K, Łykowska-Szuber L, Stawczyk-Eder K, Kreła-Kaźmierczak I, Linke K.: Simple Enterographic Activity Score for Crohn's Disease: comparison with endoscopic, biochemical, and clinical findings. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123(7-8):378-85.
44. Ferrante M, Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens GR, van der Woude CJ, Danese S, Diamond RH, Oortwijn AF, Tang KL, Miller M, Cornillie F, Rutgeerts PJ. Validation of endoscopic activity scores in patients with Crohn's disease based on a post hoc analysis of data from SONIC. International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2013 Nov;145(5):978-986.

45. Khanna R, Nelson SA, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Zou GY, MacDonald JK, Parker CE, Jairath V, Levesque BG. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Aug 8.
46. Kucharski M, Karczewski J, Mańkowska-Wierzbicka D, Karmelita-Katulaska K, Kaczmarek E, Iwanik K, Rzymiski P, Grzymisławski M, Linke K, Dobrowolska A. Usefulness of Endoscopic Indices in Determination of Disease Activity in Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:7896478.
47. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, Mary JY, Colombel JF, Rutgeerts P. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004 Oct;60(4):505-12.
48. Prantera C, Marconi S. Glucocorticosteroids in the treatment of inflammatory bowel disease and approaches to minimizing systemic activity. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013 Mar;6(2):137-56.
49. Curkovic I, Egbring M, Kullak-Ublick GA. Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates. *Dig Dis*. 2013;31(3-4):368-73.
50. Mantzaris GJ. Thiopurines and Methotrexate Use in IBD Patients in a Biologic Era. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2017 Mar;15(1):84-104.
51. McDonald JW, Wang Y, Tsoulis DJ, MacDonald JK, Feagan BG. Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Aug 6;(8): CD003459.
52. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 14;22(46):10103-10117.
53. Flynn RS, Kuemmerle JF. Konwencjonalne metody leczenia choroby Leśniowskiego-Crohna. W: *Nieswoiste zapalenia jelit*. Bickston SJ, Bloomfeld RS (red.) Wydawnictwo ELSEVIER Urban&Partner 2013: 53-61.
54. Mazzuoli S, Guglielmi FW, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G, Villanacci V. Definition and evaluation of mucosal healing in clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2013 Dec;45(12):969-77.

55. Walsh A, Palmer R, Travis S. Mucosal healing as a target of therapy for colonic inflammatory bowel disease and methods to score disease activity. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2014 Jul;24(3):367-78.
56. Adamski Z, Linke K, Samborski W Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii. (red.) Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2015, 217-410.
57. Amiot A, Serrero M, Peyrin-Biroulet L, Filippi J, Pariente B, Roblin X, Buisson A, Stefanescu C, Trang-Poisson C, Altwegg R, Marteau P, Vaysse T, Bourrier A, Nancey S, Laharie D, Allez M, Savoye G, Moreau J, Vuitton L, Viennot S, Aubourg A, Pelletier AL, Bouguen G, Abitbol V, Gagniere C, Bouhnik Y; OBSERV-IBD study group and the GETAID. One-year effectiveness and safety of vedolizumab therapy for inflammatory bowel disease: a prospective multicentre cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017 Aug;46(3):310-321.
58. Simon EG, Samuel S, Ghosh S, Moran GW. Ustekinumab: a novel therapeutic option in Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Aug;16(8):1065-74
59. Flamant M, Roblin X. Inflammatory bowel disease: towards a personalized medicine. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018 Jan 10;11:1756283X17745029.
60. Siddiqui I, Majid H, Abid S. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017 Feb 6;8(1):39-46.
61. Ministro P, Martins D. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Apr;11(4):317-328.
62. Turkyay C, Kasapoglu B. Noninvasive methods in evaluation of inflammatory bowel disease: where do we stand now? An update. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Feb;65(2):221-31.
63. Kondera-Anasz Z, Marek Z, Mielczarek-Palacz A i wsp. Kalprotektyna –budowa i funkcje. *Pol Arch Med Wewn* 2006, CXV, 3(3).
64. Burri E, Beglinger C. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Feb;8(2):197-210.

65. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, Clar C, Johnston R. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.*
66. Banerjee A, Srinivas M, Eyre R, Ellis R, Waugh N, Bardhan KD, Basumani P. Faecal calprotectin for differentiating between irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: a useful screen in daily gastroenterology practice. *Frontline Gastroenterol.* 2015 Jan;6(1):20-26.
67. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Dec;18(12):2218-24.
68. Lee YW, Lee KM, Lee JM, Chung YY, Kim DB, Kim YJ, Chung WC, Paik CN. The usefulness of fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease activity. *Korean J Intern Med.* 2018 Jan 20
69. Jusué V, Chaparro M, Gisbert JP. Accuracy of fecal calprotectin for the prediction of endoscopic activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2017 Dec 30. pii: S1590-8658(17)31359-2.
70. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Dec;18(12):2218-24.
71. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, Ruiz A, Rodríguez L, Guardiola J.A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2013 Dec;7(12):e641-51.
72. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Benazzato L, Martinato M, Lamboglia F, Oliva L, Sturniolo GC. Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease? *Am J Gastroenterol.* 2008 Aug;103(8):2007-14.
73. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin - a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly.* 2012 Apr 5;142:w13557.

74. Vakhrusheva TV, Grigorieva DV, Gorudko IV, Sokolov A, Kostevich VA, Lazarev VN, Vasilyev VB, Cherenkevich SN, Panasenko OM. Enzymatic and bactericidal activity of myeloperoxidase in conditions of halogenative stress. *Biochem Cell Biol.* 2018 Feb 2.
75. Soerensen M, Soerensen SPL. The protein in whey. *C R Trav Lab Carlsberg* 1939; 23: 55-99
76. Johansson BG. Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta Chem Skand* 1960; 14: 510-512
77. Groves ML. The isolation of a red protein from milk. *J Am Chem Soc* 1960; 82: 3345-3350
78. Montrenil I, Tonnelat J, Mullet S. Preparation et proprietes de la lactosiderophilin (lactotransferrin) du lait de femme. (preparation and properties of laktotransferrin of human milk) *Biochim Biophys Acta* 1960; 45: 413-421
79. Lis J, Orczyk-Pawłowicz M, Kątnik-Prastowska I. Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013; 67: 529-547.
80. Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;90(3):233-44
81. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Nov;62(22):2549-59.
82. Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, Norris GE, Rumball SV, Waters JM, Baker EN. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Apr;84(7):1769-73.
83. Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2531-2539
84. Artym J. Laktoferyna- niezwykle białko. Warszawa 2012, Wydawnictwo Borgis, 21-27.
85. Artym J. Laktoferyna- niezwykle białko. Warszawa 2012, Wydawnictwo Borgis, 77-184.
86. Wang Y, Pei F, Wang X, Sun Z, Hu C, Dou H. Diagnostic accuracy of fecal lactoferrin for inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Oct 1;8(10):12319-32.

87. Gisbert JP, McNicholl AG, Gomollon F. Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Nov;15(11):1746-54.
88. Sorrentino D, Franck C. Utility of Fecal Markers to Diagnose and Monitor Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol*. 2015 Dec;110(12):1732-3.
89. Borkowska A, Liberek A, Łuczak G, Jankowska A, Plata-Nazar K, Korzon M, Kamińska B. Fecal lactoferrin, a marker of intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):541-5.
90. Klimczak K, Lykowska-Szuber L, Eder P, Krela-Kazmierczak I, Stawczyk-Eder K, Szymczak A, Michalak M, Studniarek A, Linke K. The diagnostic usefulness of fecal lactoferrin in the assessment of Crohn's disease activity. *Eur J Intern Med*. 2015 Oct;26(8):623-7.
91. Kane SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lysterly D, Camilleri M, Hanauer SB. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol*. 2003 Jun;98(6):1309-14.
92. Zhou XL, Xu W, Tang XX, Luo LS, Tu JF, Zhang CJ, Xu X, Wu QD, Pan WS. Fecal lactoferrin in discriminating inflammatory bowel disease from Irritable bowel syndrome: a diagnostic meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2014 Jul 7;14:121.
93. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, Sandborn WJ, Feagan BG. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*. 2015 Jun;110(6):802-19.
94. Sipponen T, Björkesten CG, Färkkilä M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scand J Gastroenterol*. 2010 Mar;45(3):325-31.
95. Sipponen T, Savilahti E, Kärkkäinen P, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14(10):1392-8.
96. Łykowska-Szuber L, Klimczak K, Eder P, Krela-Kazmierczak I, Stawczyk-Eder K, Michalak M, Studniarek A, Kościński T, Szymczak A, Linke K. Diagnostic importance

- of fecal markers in long-term monitoring of anti-TNF- α therapy in primary responders with Crohn's disease. *Prz Gastroenterol.* 2016;11(4):232-238.
97. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Nov 15;28(10):1221-9.
 98. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Sep;10(5):661-5.
 99. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.* 2006 Mar;55(3):426-31.
 100. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol.* 2008 Jan;103(1):162-9
 101. Mańkowska-Wierzbicka D, Karczewski J, Poniedziałek B, Grzymisławska M, Staszewski R, Królczyk A, Dobrowolska A, Grzymisławski M. C-reactive protein as a diagnostic and prognostic factor in inflammatory bowel diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016 Nov 7;70(0):1124-1130.
 102. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Diamond R, Rutgeerts P, Tang LK, Cornillie FJ, Sandborn: Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *WJ.Gut.* 2014 Jan;63(1):88-95.
 103. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 Aug;11(8):707-12.
 104. Sipponen T. Diagnostics and prognostics of inflammatory bowel disease with fecal neutrophil-derived biomarkers calprotectin and lactoferrin. *Dig Dis.* 2013;31(3-4):336-44.
 105. Magro F, Sousa P, Ministro P. C-reactive protein in Crohn's disease: how informative is it? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 May;8(4):393-408.

106. Eklund CM. Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv Clin Chem.* 2009;48:111-36.
107. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017 Summer;10(3):155-167.
108. Danese S, Motte Cd Cde L, Fiocchi C. Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:938–45.
109. Lahiff C, Safaie P, Awais A, Akbari M, Gashin L, Sheth S, Lembo A, Leffler D, Moss AC, Cheifetz AS. The Crohn's disease activity index (CDAI) is similarly elevated in patients with Crohn's disease and in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Apr;37(8):786-94.
110. Jensen MD, Kjeldsen J, Nathan T. Fecal calprotectin is equally sensitive in Crohn's disease affecting the small bowel and colon. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 694-700.
111. Stawczyk-Eder K, Eder P, Lykowska-Szuber L, Krela-Kazmierczak I, Klimczak K, Szymczak A, Szachta P, Katulska K, Linke K. Is faecal calprotectin equally useful in all Crohn's disease locations? A prospective, comparative study. *Arch Med Sci.* 2015 Apr 25;11(2):353-61.
112. Hale MF, Drew K, McAlindon ME, Sidhu R. The diagnostic accuracy of faecal calprotectin and small bowel capsule endoscopy and their correlation in suspected isolated small bowel Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Oct;28(10):1145-50.
113. Bar-Gil Shitrit A, Koslowsky B, Livovsky DM, Shitrit D, Paz K, Adar T, Adler SN, Goldin E.: A prospective study of fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of small bowel Crohn's disease in patients undergoing capsule endoscopy. *Scand J Gastroenterol.* 2017 Mar;52(3):328-333.
114. Sidhu R, Sanders DS, Wilson P, Foye L, Morley S, McAlindon ME Faecal lactoferrin, capsule endoscopy and Crohn's disease. Is there a three way relationship? A pilot study. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010 Sep;19(3):257-60.
115. Lasson A, Stotzer PO, Öhman L, Isaksson S, Sapanara M, Strid H. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2015 Jan;9(1):26-32.

116. Kristensen V, Malmstrøm GH, Skar V, Røseth A, Moum B. Clinical importance of faecal calprotectin variability in inflammatory bowel disease: intra-individual variability and standardisation of sampling procedure. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(5):548-55.
117. Calafat M, Cabré E, Mañosa M, Lobatón T, Marín L, Domènech E. High within-day variability of fecal calprotectin levels in patients with active ulcerative colitis: what is the best timing for stool sampling? *Inflamm Bowel Dis*. 2015 May;21(5):1072-6.
118. Terheggen G, Lanyi B, Schanz S, Hoffmann RM, Böhm SK, Leifeld L, Pohl C, Kruis W. Safety, feasibility, and tolerability of ileocolonoscopy in inflammatory bowel disease. *Endoscopy*. 2008 Aug;40(8):656-63.
119. Kopylov U, Yung DE, Engel T, Avni T, Battat R, Ben-Horin S, Plevris JN, Eliakim R, Koulaouzidis A. Fecal calprotectin for the prediction of small-bowel Crohn's disease by capsule endoscopy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Oct;28(10):1137-44.
120. Olsen PA, Fossmark R, Qvigstad G. Fecal calprotectin in patients with suspected small bowel disease--a selection tool for small bowel capsule endoscopy? *Scand J Gastroenterol*. 2015 Mar;50(3):272-7.
121. Magro F, Lopes SI, Lopes J, Portela F, Cotter J, Lopes S, Moreira MJ, Lago P, Peixe P, Albuquerque A, Rodrigues S, Silva MR, Monteiro P, Lopes C, Monteiro L1, Macedo G3, Veloso L, Camila C, Afonso J, Geboes K, Carneiro F; Portuguese IBD group [GEDII]. Histological Outcomes and Predictive Value of Faecal Markers in Moderately to Severely Active Ulcerative Colitis Patients Receiving Infliximab. *J Crohns Colitis*. 2016 Dec;10(12):1407-1416.
122. Vieira A, Fang CB, Rolim EG, Klug WA, Steinwurz F, Rossini LG, Candelária PA. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. *BMC Res Notes*. 2009 Oct 29;2:221.
123. Caccaro R, D'Incá R, Sturniolo GC. Clinical utility of calprotectin and lactoferrin as markers of inflammation in patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 Jul;6(4):551-8.

124. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, Ruiz A, Rodríguez L, Guardiola J. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(12):e641-51.
125. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Dec;18(12):2218-24.
126. Yamamoto T, Shiraki M, Bamba T, Umegae S, Matsumoto K. Faecal calprotectin and lactoferrin as markers for monitoring disease activity and predicting clinical recurrence in patients with Crohn's disease after ileocolonic resection: A prospective pilot study. *United European Gastroenterol J*. 2013 Oct;1(5):368-74
127. Mazzuoli S, Guglielmi FW, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G, Villanacci V. Definition and evaluation of mucosal healing in clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2013 Dec;45(12):969-77.
128. Khanna R, Bouguen G, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Dubcenco E, Baker KA, Levesque BG. A systematic review of measurement of endoscopic disease activity and mucosal healing in Crohn's disease: recommendations for clinical trial design. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Oct;20(10):1850-61.
129. Tontini GE, Bisschops R, Neumann H. Endoscopic scoring systems for inflammatory bowel disease: pros and cons. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jul;8(5):543-54.
130. Christensen B, Rubin DT. Understanding Endoscopic Disease Activity in IBD: How to Incorporate It into Practice. *Curr Gastroenterol Rep*. 2016 Jan;18(1):5.
131. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Dec;16(12):2131-6.
132. Novak G, Parker CE, Pai RK, MacDonald JK, Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Jairath V, Khanna R. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jul 21;7:CD012351.
133. Quigley EM. Overlapping irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: less to this than meets the eye? *Therap Adv Gastroenterol*. 2016 Mar;9(2):199-212.

134. Hoekman DR, Zeevenhooven J, D'Haens GR, Benninga MA. The prevalence of irritable bowel syndrome-type symptoms in inflammatory bowel disease patients in remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep;29(9):1086-1090.
135. Wright EK. Calprotectin or Lactoferrin: Do They Help. *Dig Dis.* 2016;34(1-2):98-104.

10. SPIS RYCIN I TABEL

10.1 Spis rycin

Rycina 1.	Lokalizacja zmian w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna w obrębie przewodu pokarmowego.	11
Rycina 2.	Budowa przestrzenna laktoferyny.	32
Rycina 3.	Korelacja stężenia laktoferyny ze stężeniem kalprotektyny w kale w całej grupie badanej.	52
Rycina 4.	Krzywa ROC (ang. receiver operating characteristic curve) dla oceny wartości FL, pozwalającej na różnicowanie aktywnej i nieaktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna w odniesieniu do aktywności endoskopowej.	53
Rycina 5.	Krzywa ROC (ang. receiver operating characteristic curve) dla oceny wartości FL, pozwalającej na różnicowanie aktywnej i nieaktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna w odniesieniu do całkowitej aktywności choroby, ocenianej zarówno endoskopowo, jak i w enterografii rezonansu magnetycznego.	54

10.2 Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja montrealaska choroby Leśniowskiego-Crohna.	16
Tabela 2. Indeks oceny aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna Crohn's Disease Activity Index (CDAI).	21
Tabela 3. Skala Harveya-Bradshawa oceny aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna.	23
Tabela 4. Prosta enterograficzna skala oceny aktywności choroby Leśniowskiego- Crohna - Simple Enterographic Activity Score of Crohns Disease (SEAS-CD)	25
Tabela 5. Prosty indeks oceny aktywności endoskopowej choroby Leśniowskiego-Crohna – Simple Endoscopic Score for Crohn's Diseases (SES-CD). Całkowita punktacja w tej skali jest sumą punktów, ocenianych osobno w 5 segmentach jelita: odbytnicy, esicy i okrężnicy zstępującej, okrężnicy poprzecznej, okrężnicy wstępującej i kątnicy oraz jelicie krętym	26
Tabela 6. Charakterystyka całej grupy badanej.	37
Tabela 7. Charakterystyka podgrupy L1 - chorzy z izolowaną lokalizacją zmian zapalnych w jelicie cienkim.	39
Tabela 8. Charakterystyka podgrupy L2 - chorzy z izolowaną lokalizacją zmian zapalnych w jelicie grubym.	40
Tabela 9. Charakterystyka podgrupy L3 - chorzy z lokalizacją zmian zapalnych zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym.	41
Tabela 10. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych w całej grupie badanej.	49
Tabela 11. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań endoskopowych i obrazowych w całej grupie badanej (n=101).	51

Tabela 12. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z izolowaną lokalizacją zmian w jelicie cienkim (L1).	56
Tabela 13. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań obrazowych w podgrupie L1 (izolowane zmiany chorobowe w jelicie cienkim).	58
Tabela 14. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z izolowaną lokalizacją zmian w jelicie grubym (L2).	59
Tabela 15. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań endoskopowych w podgrupie L2 (izolowane zmiany chorobowe w jelicie grubym).	61
Tabela 16. Stężenie laktoferyny w kale oraz wyniki badań dodatkowych wśród chorych z lokalizacją zmian zapalnych w jelicie cienkim i grubym (L3).	63
Tabela 17. Korelacje pomiędzy FL, parametrami kliniczno-biochemicznymi, wynikami badań obrazowych i endoskopowych w podgrupie L3 (zmiany chorobowe w jelicie cienkim i grubym).	64
Tabela 18. Porównanie stężeń laktoferyny, CRP oraz CDAI w badanej grupie w zależności od lokalizacji zmian chorobowych. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD).	65
Tabela 19. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w całej grupie badanej. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD).	66
Tabela 20. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w podgrupie L1 (izolowane zmiany w jelicie cienkim). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD).	66

Tabela 21. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), w podgrupie L2 (izolowane zmiany w jelicie grubym). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). 67

Tabela 22. Porównanie stężeń laktoferyny w kale w zależności od aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna, mierzonej indeksem Crohn's Disease Activity Index (CDAI), wśród chorych z postacią L3 choroby (zmiany zapalne zarówno w jelicie cienkim jak i grubym). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). 67