

Anna Borkowska

**Laktoferyna w kale jako wykładnik
aktywności procesu zapalnego w
nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
Promotor: Prof. dr hab. n med. Maria Korzon

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci AMG
Gdańsk 2008

SPIS TREŚCI:

1. WSTĘP.....	4
1.1. Wprowadzenie.....	4
1.2. Laktoferyna.....	4
1.2.1. Laktoferyna – historia	4
1.2.2. Laktoferyna – struktura i właściwości.....	4
1.2.3. Laktoferyna a transferyna.....	6
1.2.4. Laktoferyna – wydzielanie i metabolizm.....	6
1.2.5. Rola laktoferyny.....	7
1.2.5.1. Właściwości bakteriostatyczne.....	7
1.2.5.2. Właściwości bakteriobójcze.....	8
1.2.5.3. Inne właściwości antybakteryjne.....	9
1.2.5.4. Właściwości przeciwwirusowe.....	9
1.2.5.5. Właściwości przeciwgrzybicze.....	11
1.2.5.6. Właściwości przeciw pasożytnicze.....	11
1.2.5.7. Właściwości przeciwzapalne laktoferyny.....	11
1.2.5.8. Laktoferyna i reaktywne formy tlenu.....	12
1.2.5.9. Właściwości przeciwnowotworowe laktoferyny.....	13
1.2.5.10. Laktoferyna a organizm noworodka.....	14
1.2.6. Stężenie laktoferyny we krwi i innych płynach ustrojowych.....	14
1.2.7. Przydatność diagnostyczna oznaczania stężeń laktoferyny w różnych materiałach biologicznych.....	15
1.2.7.1. Laktoferyna w kale.....	15
1.2.7.2. Laktoferyna w płynie mózgowo – rdzeniowym.....	17
1.2.7.3. Oznaczanie laktoferyny w moczu.....	17
1.2.8. Wykorzystanie laktoferyny w leczeniu.....	17
1.3. Nieswoiste zapalenia jelit.....	18
1.3.1. Wprowadzenie.....	18
1.3.2. Epidemiologia.....	18
1.3.3. Etiologia.....	19
1.3.4. Obraz kliniczny.....	21
1.3.5. Zmiany morfologiczne w obrębie przewodu pokarmowego.....	22
1.3.6. Diagnostyka.....	22

1.3.7. Powikłania nieswoistych zapaleń jelit.....	24
1.3.8. Leczenie.....	24
2. CEL PRACY.....	26
3. MATERIAŁ I METODY.....	27
3.1. Pacjenci i grupa porównawcza.....	27
3.2. Badania dodatkowe.....	27
3.3. Wskaźniki aktywności choroby.....	29
3.4. Oznaczanie laktoferyny w kale.....	29
3.5. Metody statystyczne.....	31
4. WYNIKI.....	33
4.1. Wprowadzenie.....	33
4.2. Grupa porównawcza.....	33
4.3. Wartości referencyjne stężenia laktoferyny w kale.....	36
4.4. Krzywa ROC.....	37
4.5. Grupa dzieci chorych.....	38
4.5.1. Stężenie laktoferyny w kale w zależności od płci dzieci chorych.....	43
4.5.2. Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od rozpoznania.....	46
4.5.3. Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby.....	50
4.5.4. Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od stopnia nasilenia zmian endoskopowych.....	56
4.5.5. Stężenie laktoferyny w kale a inne parametry stanu zapalnego u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.....	59
4.5.6. Stężenie laktoferyny w kale a lokalizacja zmian chorobowych w grupie dzieci chorych.....	69
4.6. Podsumowanie wyników.....	71
5. DYSKUSJA.....	72
6. WNIOSKI.....	85

7. ANEKS.....	86
8. PIŚMIENNICTWO.....	89
9. STRESZCZENIE.....	101

1. WSTĘP

1. 1. Wprowadzenie

Ocena aktywności procesu zapalnego w NZJ stanowi od lat wyzwanie dla wielu badaczy. We krwi czy też w stolcu odkrywane są kolejne markery procesu zapalnego. Jednym z nich jest laktoferyna, białko odznaczające się wyjątkową stabilnością, wydzielane przez granulocyty obojętnochłonne. Stężenie laktoferyny oznaczane jest w kale. Począwszy od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się doniesienia wskazujące na przydatność tego badania w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu NZJ. Podstawową zaletę oznaczania laktoferyny jako markera stanu zapalnego jest łatwość uzyskania materiału biologicznego, w którym dokonywany jest pomiar. Podkreślenia wymaga fakt całkowitej nieinwazyjności powyższego badania, a więc możliwość jego wielokrotnego powtarzania. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny przydatności oznaczania tego parametru u dzieci z NZJ.

1. 2. Laktoferyna

1. 2. 1. Laktoferyna – historia

Laktoferyna jest białkiem należącym do grupy transferyn, posiadającym zdolność wiązania żelaza. Po raz pierwszy została wyizolowana przez Soerensena w 1939 roku, w mleku krowim (1). W mleku ludzkim laktoferynę opisał w 1960 roku jednocześnie trzech niezależnych badaczy (2,3,4). Początkowo nowo odkryte białko nazwano laktotransferyną. Człon *lakto-* wynikał z faktu, iż pierwotnie wyizolowano ją z mleka, a część *-transferyna* z przypuszczalnego podobieństwa jej funkcji do znanej już wcześniej transferyny (4). Charakterystyczną cechą był intensywny czerwony kolor, który występował po inkubacji białka w obecności jonów żelazowych (Fe^{+3}) (3,5).

1. 2. 2. Laktoferyna – struktura i właściwości

Laktoferyna jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 80 kDa. Ze względu na wielkość i budowę, należy do grupy białek zwanych transferynami, których główną cechą charakterystyczną jest zdolność wiązania żelaza (6,7). Laktoferynę cechuje bardzo duże powinowactwo do jonów żelaza (5). W związku z tym jej głównej funkcji upatrywano pierwotnie w udziale w metabolizmie żelaza (wchłanianie żelaza w jelicie u

dzieci karmionych piersią). Przypisywano jej także rolę bakteriostatyczną, polegającą na sekwestracji tego metalu, niezbędnego dla rozwoju bakterii (5). Obecnie wiadomo, że działanie laktoferyny jest zdecydowanie bardziej wielokierunkowe.

W 1984 roku opisano sekwencję aminokwasów wchodzących w skład cząsteczki laktoferyny. Zawiera ona 703 reszty aminokwasowe (5). Struktura trójwymiarowa laktoferyny została dokładnie ustalona metodą krystalograficzną z użyciem promieni Roentgena (8). Jest to białko składające się z dwóch kulistych części: płata N, składającego się z reszt 1-333, płata C z reszt 345-691 oraz wiążącego je mostka o spiralnym kształcie (reszty 334-344) (5). Oba płaty mają zbliżoną masę cząsteczkową, około 40 kDa. Są one są homologiczne i wykazują podobieństwa – mają 125 identycznych reszt (37%) w odpowiednich odcinkach białkowych. Każdy z płatów składa się z dwóch części (domen) α i β , nazwanych odpowiednio N1 i N2 oraz C1 i C2. Każdy płat posiada oddzielną szczelinę, w której wiązane jest żelazo (5).

Wyróżnia się 2 postaci laktoferyny: wolną, niezwiązaną z żelazem, inaczej nazywaną apolaktoferyną, która po związaniu żelaza przekształca się w hololaktoferynę (7). Analiza krystalograficzna ujawniła, że podczas wiązania żelaza dochodzi do dużych zmian w strukturze przestrzennej laktoferyny (5). W każdym płacie obie domeny zamykają się „wokół” cząsteczki żelaza. Odwrotnie, podczas uwalniania metalu i tworzenia apolaktoferyny zbliżone do siebie domeny „otwierają się” i z każdego płata uwalniają żelazo (5). Za każdym razem, jednocześnie oprócz jonu żelazowego (Fe^{+3}) wiązane są dwa aniony dwuwęglanowe (CO_3^{-2}) (7). Żelazo mocowane jest z czterema receptorami białkowymi; jest to wiązanie silne, ale odwracalne. Do uwolnienia metalu może dojść wskutek uszkodzenia struktury białkowej, np. przez znaczne obniżenie pH lub poprzez przyłączenie laktoferyny do receptora białkowego. Reszta dwuwęglanowa prawdopodobnie służy kontroli pH podczas uwalniania jonu żelaza. Nieobecność jonu żelaza w apolaktoferynie powoduje, że forma ta jest giętka. Różnice w strukturze wynikają z ruchów domen wokół jonu żelaza (5).

Wiadomo, że laktoferyna może wiązać nie tylko żelazo, ale także inne jony (7). Należy tu wymienić trzywartościowe jony takie jak: Ga^{+3} , Al^{+3} , Co^{+3} , Mn^{+3} i dwuwartościowe: V^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} oraz trzywartościowe lantanowce (9). Rola wiązania powyższych jonów nie jest ostatecznie wyjaśniona. Prawdopodobnie laktoferyna bierze udział w ich metabolizmie.

1. 2. 3. Laktoferyna a transferyna

Laktoferyna wykazuje wiele podobieństw do transferyny. Ich struktura przestrzenna jest bardzo podobna. Obydwie zbudowane są z dwóch części oraz posiadają identyczne miejsca wiązania żelaza (5). Sekwencja białkowa laktoferyny jest w około 60% jednakowa z sekwencją transferyny (10). Podobnie jak w laktoferynie, w zależności od związania żelaza, występują dwie postaci transferyny: apotransferyna i holotransferyna. Podobieństwa między laktoferyną a transferyną dotyczą także ich masy cząsteczkowej. Masa apotransferyny waha się w granicach 75-76,6 kDa, a apolaktoferyny 75-76,4 kDa. Natomiast masa holotransferyny wynosi 73,8-86 kDa, zaś hololaktoferyny 82,6 kDa (7). Obserwowane różnice masy cząsteczkowej wynikają przede wszystkim z różnej metodologii jej oznaczania (7).

Mimo wielu podobieństw i wspólnego pochodzenia filogenetycznego, laktoferyna i transferyna wykazują także pewne różnice. Dotyczą one sekwencji białkowej, zwłaszcza fragmentów eksponowanych na powierzchni cząsteczki, które wpływają na właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne laktoferyny, ale także jej przestrzennej formy - kształtu mostka wiążącego płyty. W transferynie mostek ten jest nieregularny i giętki, a w laktoferynie, jak już wspomniano, spiralny (5). Laktoferyna ma inne właściwości immunologiczne i antygenowe, inną rozpuszczalność w wodzie oraz punkt izoelektryczny. Jest ona białkiem zasadowym, o punkcie izoelektrycznym 8,7 (7). Natomiast pH transferyny jest kwaśne (11).

1. 2. 4. Laktoferyna – wydzielanie i metabolizm

Laktoferyna obecna jest nie tylko w mleku ludzkim i krowim. Badania wykazały, że występuje także w mleku innych ssaków. Nie stwierdzono jej obecności u innych zwierząt poza ssakami (7). Natomiast transferynę oprócz ssaków znaleziono także u owadów (5). Prawdopodobnie podczas ewolucji i pojawienia się ssaków, laktoferyna powstała wskutek duplikacji genu dla transferyny (5).

Dotychczas, poza laktoferyną ludzką, określono sekwencję białkową laktoferyny u ośmiu gatunków ssaków (świni, konia, krowy, bizona, owcy, kozy, wielbłąda i myszy) (5).

Obecnie wiadomo, że laktoferyna wydzielana jest nie tylko przez komórki gruczołów mlecznych, ale także przez inne komórki nabłonka wydzielniczego zaliczane do tzw. układu egzokrynnego. W związku z tym można wykazać jej obecność w ślinie,

łzach, nasieniu, wydzielinie śluzowej dróg oddechowych czy przewodu pokarmowego (5,12). W większości laktoferyna pochodzi z granulocytów obojętnochłonnych. Produkowana jest ona w ostatecznej formie, bez prekursorów, w postaci wolnej, niezwiązanej z żelazem (7).

Laktoferyna magazynowana jest w ziarnistościach drugorzędowych (wtórnych, swoistych), a także w trzeciorzędowych granulocytów obojętnochłonnych (7). Zmagazynowana laktoferyna może być uwalniana z ziarnistości na dwa sposoby: podczas degranulacji granulocytów dostaje się bezpośrednio do krwiobiegu i/lub otaczających tkanek lub też ziarnistości mogą połączyć się z fagosomem (5,7). Do degranulacji tych ziarnistości dochodzi pod wpływem Il-8 i wiązania niektórych immunoglobulin powierzchniowych. Stężenie laktoferyny w osoczu wzrasta w takich stanach, jak: przedawkowanie żelaza, stany zapalne, choroby zakaźne czy choroby nowotworowe (7).

Bardzo ważną cechą laktoferyny jest jej oporność na działanie trawiące enzymów proteolitycznych, takich jak tripsyna i jej pochodne (13). Ta cecha pozwala na przejście przez przewód pokarmowy w postaci niestrawionej. Jest to szczególnie istotne u dzieci karmionych piersią - laktoferyna obecna w mleku matki zostaje spożyta i następnie wchłonięta. Postać związana z żelazem (hololaktoferyna) jest bardziej odporna na procesy trawienne niż postać wolna (apolaktoferyna) (7).

Laktoferyna usuwana jest z krążenia w ciągu 24-48 godzin. Proces ten przebiega na drodze kilku mechanizmów. Pierwszy z nich polega na endocytozie laktoferyny przez makrofagi i monocyty. W drugim laktoferyna może być usuwana bezpośrednio przez komórki wątrobowe, a proces ten jest niezależny od formy laktoferyny (apo i holo). Ponadto cząsteczki laktoferyny oraz jej fragmenty znaleziono w moczu oraz w stolcu, co może pośrednio przemawiać za usuwaniem jej poprzez nerki i przewód pokarmowy (7).

1. 2. 5. Rola laktoferyny

1. 2. 5. 1. Właściwości bakteriostatyczne

Laktoferyna jest białkiem biorącym udział w odporności wrodzonej, nieswoistej człowieka oraz innych ssaków. Funkcję tę pełni przede wszystkim dzięki zdolnościom silnego wiązania żelaza, co określa jej właściwości bakteriostatyczne (14). Poprzez wiązanie i sekwestrację żelaza laktoferyna pozbawia bakterie niezbędnego czynnika odżywczego. Należy jednak pamiętać, że na drodze tego mechanizmu laktoferyna

jedynie ogranicza ich wzrost. W badaniach *in vitro* wykazano, że poprzez hamowanie wzrostu bakterii zależnych od obecności żelaza, promowany jest wzrost gatunków, które nie wymagają do swego rozwoju jego obecności. Wymienić wśród nich należy bakterie mlekowe, których obecność w przewodzie pokarmowym uważana jest za korzystną (15). W sytuacjach klinicznych, w których zachodzi konieczność suplementacji żelaza, może dojść do intensywnego wzrostu niepożądanych gatunków bakterii.

Niektóre gatunki bakterii nabyły zdolności znoszenia działania bakteriostatycznego laktoferyny. Jedną z nich jest wytwarzanie przez bakterie małych cząsteczek wiążących żelazo, tak zwanych syderoforów. Cząsteczki te konkurują z laktoferyną o wiązanie nierozpuszczalnych jonów żelaza (16). Innym sposobem pozyskania żelaza przez bakterie w sytuacji jego niedoboru jest usuwanie go z heminy (17). Niektóre szczepy bakterii Gram-ujemnych potrafią wypierać żelazo bezpośrednio z wiązania z laktoferyną lub transferyną. Do takiej reakcji dochodzi poprzez wiązanie tych białek z receptorami obecnymi na powierzchni szczepów bakteryjnych (17). Wskutek powstałej w ten sposób zmiany konfiguracji przestrzennej zmniejsza się powinowactwo laktoferyny do żelaza.

1. 2. 5. 2. Właściwości bakteriobójcze

Początkowo uważano, że obronna rola laktoferyny ograniczała się do wiązania żelaza niezbędnego do wzrostu bakterii. Obecnie wiadomo jednak, że białko to posiada także właściwości bakteriobójcze, niezależne od sekwestracji żelaza (18).

Działanie laktoferyny może być bezpośrednie lub pośrednie (19). W przypadku bakterii Gram-ujemnych, laktoferyna wiąże się z białkami obecnymi na powierzchni bakterii. Doprowadza do uwolnienia lipopolisacharydów, co powoduje wzrost przepuszczalności błony komórkowej bakterii i uwrażliwienie ich na zmianę ciśnienia osmotycznego, działanie lizozymu oraz innych czynników o właściwościach antybakteryjnych (20).

Niszczenie bakterii Gram-dodatnich odbywa się poprzez łączenie się fragmentów białka posiadających dodatni ładunek z błoną komórki bakteryjnej. Po wiązaniu błona komórkowa ulega zniszczeniu (17).

1. 2. 5. 3. Inne właściwości antybakteryjne

Udowodniono, że laktoferyna wypełnia swoją funkcję obronną także dzięki właściwościom proteolitycznym, skierowanym przeciw wydzielanym przez bakterie czynnikom zwiększającym wirulencję. Może powodować ona degradację proteazy IgA1 produkowanej przez *Haemophilus influenzae*. Aktywność antyproteazowa, podobna do seryny, zlokalizowana jest prawdopodobnie w domenie N (17). Odkryto także, że laktoferyna hamuje inwazyjność szczepu M90T *Shigella flexneri*, poprzez uwalnianie, a następnie niszczenie antygenów plazmidowych B i C (Ipa B i Ipa C) (17). Laktoferyna może ponadto uwalniać peptyd laktoferrycynę. Laktoferrycyna jest fragmentem pętli pierwotnego białka, składającym się z dodatnio naładowanych zasadowych reszt aminokwasowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Laktoferrycyna posiada także właściwości antybakteryjne (21). Z domeny N1 laktoferyny uwalniane jest ponadto inne białko posiadające właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze – laktoferrampina (22). Laktoferyna może wzmacniać działanie przeciwbakteryjne lizozymu (19), ponadto może ona hamować wiązanie bakterii z tkankami docelowymi, przez co utrudnia ich zasiedlanie (19). Działanie to udowodniono u pacjentów z mukowiscydozą. Skład wydzieliny śluzowej dróg oddechowych różni się w tej grupie chorych znacznie w porównaniu z ludźmi zdrowymi. Zawiera więcej jonów sodu, chloru, ale także żelaza, co sprzyja infekcji oraz powstawaniu reaktywnych form tlenu. Typowymi bakteriami kolonizującymi i będącymi czynnikiem etiologicznym infekcji dróg oddechowych u tych pacjentów są *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas cepacia*. Laktoferyna poprzez wiązanie żelaza hamuje adhezję tych bakterii i tworzenie przez nie biofilmu (17).

Właściwości przeciwbakteryjne laktoferyny wynikają nie tylko z bezpośredniego jej działania na bakterie, ale także z wpływu na układ immunologiczny poprzez indukowanie wielu pośrednich reakcji biorących udział w systemie obronnym. Mają one szczególne znaczenie w czasie endotoksemii oraz wstrząsu septycznego. Na modelach zwierzęcych udowodniono, że laktoferyna zmniejsza produkcję cytokin prozapalnych takich jak: Il-6, Il-1, TNF- α , a zwiększa natomiast Il-4 i Il-10 (19).

1. 2. 5. 4. Właściwości przeciwwirusowe

W 1987 roku przeprowadzono badania doświadczalne na zwierzętach, w których udowodniono, że laktoferyna posiada także właściwości przeciwwirusowe (23). Aktywność ta dotyczy zarówno wirusów bezotoczkowych, jak i otoczkowych. *Beljaars*

i wsp. wykazali w badaniach na szczurach zakażonych wirusem cytomegalii, że podawanie laktoferyny znacząco obniżało wiramię. Obserwowano to jednak tylko wówczas, gdy szczury były zakażane wirusem w postaci pozakomórkowej. Na tej podstawie autorzy wyciągnęli wniosek, że prawdopodobnie laktoferyna blokuje wejście wirusa do komórki gospodarza (24). Hipotezę tę potwierdzają także inne badania z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Laktoferyna wpływa na początkowe etapy infekcji wirusowej: adsorpcję oraz wnikanie wirusa do infekowanych komórek. W linii komórkowej ludzkich komórek jelitowych udowodniono, że dodanie krowiej laktoferyny hamowało przyłączanie rotawirusów do enterocytów; laktoferyna miała negatywny wpływ także na kolejne etapy ich rozwoju (25).

Podobne wyniki dały badania nad enterowirusami: laktoferyna hamowała wczesne etapy infekcji (25). Analogicznie sytuacja przedstawiała się w przypadku innej grupy wirusów bezotoczkowych – adenowirusów. Są one częstym czynnikiem infekcyjnym u dzieci. Obraz kliniczny zakażenia adenowirusami bywa zróżnicowany: dotyczy zarówno układu oddechowego, jak i przewodu pokarmowego (zapalenie gardła, płuc, biegunka). Laktoferyna wypiera cząsteczki adenowirusów z wiązania z glikozaminoglikanami, będącego pierwszym etapem ataku na komórkę docelową. Ponadto laktoferyna może wiązać się z zewnętrznymi łańcuchami białkowymi wirusa, odpowiedzialnymi za adhezję do komórki docelowej i w ten sposób także hamować działanie wirusa (25). Kolejnym wirusem, którego wejście do komórki docelowej jest blokowane przez laktoferynę, jest wirus opryszczki zwykłej (*Herpes simplex*) (26). Laktoferyna wywiera działanie także na wirus HIV. Aktualnie, w sytuacji braku szczepień przeciw wirusowi HIV, zagadnienie to jest przedmiotem wielu badań. Laktoferyna blokuje połączenie się wirusa HIV z komórką docelową oraz jego wejście do komórki, oddziałując w ten sposób na wczesne etapy aktywności wirusa (27,28).

Ostatnio w piśmiennictwie pojawiły się obiecujące doniesienia dotyczące zastosowania laktoferyny u dzieci wertykalnie zakażonych wirusem HIV. Ocenie poddano wiramię w osoczu oraz liczbę limfocytów CD4+ przed podaniem laktoferyny, po 3 i po 6 miesiącach leczenia oraz 6 miesięcy po zakończeniu terapii. Obserwowano znamienne obniżenie wiramii, a liczba limfocytów CD4+ po zakończeniu terapii wzrastała. Efekt ten był jeszcze wyraźniejszy, gdy laktoferynę stosowano jednocześnie z lekami antyretrowirusowymi (29).

Wykazano, że w linii komórkowej ludzkich hepatocytów laktoferyna zapobiega zakażeniu wirusami hepatotropowymi (HBV, HCV), działając także na wczesne etapy infekcji (30,31).

1. 2. 5. 5. Właściwości przeciwgrzybicze

Laktoferyna wykazuje działanie przeciwgrzybicze, przede wszystkim przeciw drożdżakom (*Candida*). Właściwości te ujawniają się jednak dopiero przy wysokich stężeniach laktoferyny i zależą od gatunku drobnoustroju. Mają zwykle charakter hamujący a nie grzybobójczy. W badaniach *in vitro* postać nie związana laktoferyny (apolaktoferyna) wykazuje bezpośredni efekt toksyczny na drożdże *Candida albicans*. Działanie to jest jednak zależne od takich czynników fizycznych jak pH i temperatura otoczenia, w związku z tym w warunkach *in vivo* jest prawie całkowicie wyeliminowane i nie ma praktycznego znaczenia. Działanie przeciwgrzybicze laktoferyny uwarunkowane jest prawdopodobnie przez wiązanie jonów żelaza z otoczenia drożdżaków. *In vivo* działanie przeciwgrzybicze laktoferyny udowodniono w infekcjach *Trichophyton mentagrophytes*. Świnkom morskim z infekcją zlokalizowaną na skórze grzbietu, podawano doustnie laktoferynę, uzyskując znaczne przyspieszenie gojenia rany. U ludzi podobne badania przeprowadzono u pacjentów z grzybicą stóp (19).

1. 2. 5. 6. Właściwości przeciw pasożytnicze

W porównaniu z właściwościami przeciwbakteryjnymi liczba badań dotyczących właściwości przeciw pasożytniczych laktoferyny jest niewielka, aczkolwiek także i to działanie laktoferyny zostało potwierdzone. Najczęściej przedstawiana jest jej aktywność wobec tachyzoitów *Toxoplasma gondii*. Wykazano, że laktoferyna nie ma wpływu na wniknięcie tego drobnoustroju do komórek gospodarza, hamuje natomiast dalszy, wewnątrzkomórkowy rozwój pasożyta (32). Istnieją jednak doniesienia, w których dowiedziono, że hololaktoferyna może poprzez uwalnianie żelaza ułatwiać rozwój pasożytów. Sytuacja taka dotyczy np. *Trichomonas vaginalis* (32).

1. 2. 5. 7. Właściwości przeciwzapalne laktoferyny

Laktoferyna oprócz swojego działania przeciwbakteryjnego, przeciwwirusowego, przeciwgrzybiczego i przeciw pasożytniczego może wpływać na przebieg reakcji zapalnej, zarówno tej współtowarzyszącej infekcjom, jak i tej wywołanej innymi

czynnikami (6). Hamuje ona procesy zapalne poprzez zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy guza α (TNF- α), interleukina 1 β (IL-1 β) czy interleukina 6 (IL-6) (6,33). Laktoferyna doprowadza także do obniżenia ich produkcji poprzez mononukleary, uprzednio aktywowane lipopolisacharydami (34). W ten sposób zmniejsza nasilenie reakcji zapalnej zarówno powstałej w czasie infekcji, jak i w przebiegu schorzeń o innej etiologii, np. alergii. Zwiększa ponadto sekrecję cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i IL-4 (34).

Udział w funkcji przeciwzapalnej laktoferyny przypisać należy wiązaniu lipopolisacharydów przez laktoferynę, białko uwalniane z laktoferyny. Znane są liczne przykłady takiego działania: podanie laktoferyny zmniejsza zapalenie błony śluzowej żołądka wywołane przez *Helicobacter pylori* (35) oraz utrzymuje integralność błony śluzowej jelita po prowokacji lipopolisacharydami (36).

Choroby zapalne, w których występuje podwyższony poziom laktoferyny to schorzenia neurodegeneracyjne (choroba Alzheimerera, choroba Parkinsona) (37), NZJ (38), choroby alergiczne (odczyny skórne i astma) oraz zapalenia stawów (6). Co więcej, w badaniach na modelu zwierzęcym tych chorób, podanie laktoferyny zmniejszało nasilenie stanu zapalnego (39,40). Laktoferyna może łączyć się z różnymi receptorami na powierzchni komórek układu odpornościowego, takich jak neutrofile, monocyty, makrofagi, limfocyty czy komórki mikrogleju. Prawdopodobnie wywiera ona w ten sposób pośredni wpływ na procesy zapalne, hamując produkcję cytokin prozapalnych.

1. 2. 5. 8. Laktoferyna i reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu (RFT) i ich formy pokrewne (tlenek azotu, dwutlenek azotu, wolne rodniki tlenowe) powstają w każdym organizmie w wyniku reakcji oksydoredukcyjnych. W warunkach fizjologicznych istnieje dynamiczna równowaga między ich produkcją a degradacją. W sytuacjach patologicznych (przewlekłe stany zapalne, narażenie na czynniki kancerogenne) ich liczba może ulec zwiększeniu, przez co stanowią poważne zagrożenie dla ustroju. Zwiększenie RFT, produkowanych przez komórki zapalne w niektórych przewlekłych chorobach zapalnych, może prowadzić do rozwoju nowotworu, np. we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, przewlekłym zapaleniu wątroby czy w chorobie wrzodowej żołądka. Laktoferyna, poprzez wiązanie żelaza potrzebnego do wytwarzania reaktywnych form tlenu, ma działanie antyoksydacyjne (6).

1. 2. 5. 9. Właściwości przeciwnowotworowe laktoferyny

W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się publikacje poruszające temat roli, jaką laktoferyna odgrywa w powstawaniu i zwalczaniu nowotworów (41). Początkowo były to doświadczenia oparte o badania na modelach zwierzęcych oraz liniach komórkowych. Obecnie istnieją doniesienia dotyczące pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową, którym podawano laktoferynę z dobrym efektem (42). Badania są tak obiecujące, że być może leczenie laktoferyną wejdzie na stałe do schematów terapii choroby nowotworowej. Ponadto laktoferyna wydaje się być dobrym środkiem o działaniu chemioprewencyjnym: podawana jest doustnie i nie wywołuje działań niepożądanych (43).

Właściwości przeciwnowotworowe laktoferyny wynikają z działania na drodze mechanizmów pośrednich i bezpośrednich. Pierwszy z nich to szereg reakcji immunomodulujących. Laktoferyna zwiększa ilość i aktywność limfocytów T CD8+, CD4+ oraz komórek NK. Prawdopodobnie wynika to ze wzrostu poziomu Il-18, uznanej za farmakokinetyczny wskaźnik aktywności laktoferyny. Laktoferyna stymuluje również fagocytozę oraz działania cytotoksyczne granulocytów obojętnochłonnych oraz makrofagów, wzmacnia ponadto ekspresję łańcucha ζ (dzeta) na powierzchni limfocytów. Łańcuch ten stanowi ogniwo w przekazywaniu sygnału z powierzchni komórki, która związała antygen.

Laktoferyna może także wpływać na adhezję poszczególnych komórek. Wydaje się ponadto, że białko to posiada właściwości cytotoksyczne: w badaniach na zwierzętach wykazano zmniejszenie masy guza po bezpośredniej iniekcji laktoferyny do zmiany. Ponadto laktoferyna bezpośrednio wspomaga apoptozę, hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz hamuje angiogenezę nowotworów. Angiogeneza guza jest jednym z kluczowych warunków niezbędnych do jego rozwoju. Pierwsze doniesienia dotyczące właściwości antyangiogennych laktoferyny pochodzą z 1998 roku. Badanie przeprowadzono u myszy z wszczepionym czerniakiem B16 i chłoniakiem L5178Y. U zwierząt, którym podawano podskórną laktoferynę, obserwowano zmniejszenie masy guza, ustępowanie przerzutów oraz redukcję liczby naczyń zaopatrujących guz (43).

Powstawanie reaktywnych form tlenu ma miejsce w każdym żywym organizmie. Istnieje wiele czynników zwiększających ilość tych form, jak np. narażenie na ksenobiotyki czy przewlekły stan zapalny. Reaktywne formy tlenu indukują powstanie

wielu onkogenów i w następstwie rozwój nowotworów. Laktoferyna wykazując działanie antyoksydacyjne może w ten sposób działać również przeciwnowotworowo, głównie na drodze sekwestracji żelaza, którego nadmiar promuje powstawanie reaktywnych form tlenu (43).

1. 2. 5. 10. Laktoferyna a organizm noworodka

Jak wspomniano laktoferyna oporna jest na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego, a przy udziale receptorów znajdujących się na powierzchni komórek kosmków jelitowych może być wchłaniana z jelita. Poprzez tworzenie kompleksów z żelazem wzmacnia jego wchłanianie. Prawdopodobnie kompleks laktoferyna-żelazo wiąże się ze swoistym receptorem na powierzchni enterocyta i ulega wchłonięciu. Można tym tłumaczyć fakt, iż dostępność żelaza z mleka kobiecego jest około 10 razy większa niż z mleka krowiego (44). Laktoferyna uczestniczy we wchłanianiu manganu, cynku oraz wodorowęglanów. Wiązanie laktoferyny z żelazem ma także znaczenie w funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej. Żelazo w postaci mineralnej jest bowiem katalizatorem reakcji, w której powstaje rodnik hydroksylowy zaliczany do reaktywnych form tlenu, które są szkodliwe dla komórek nabłonka jelitowego gospodarza (44).

Laktoferyna bierze udział w kształtowaniu flory bakteryjnej przewodu pokarmowego u noworodka. Poprzez działanie bakteriostatyczne związane z sekwestracją żelaza oraz wiązanie się z adhezynami bakteryjnymi, laktoferyna ogranicza wzrost flory patogennej, umożliwiając zasiedlenie jelita przez bakterie z grupy *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*. Ze względu na wymienione powyżej właściwości laktoferyny, trwają badania dowodzące skuteczności suplementacji mieszanek mlecznych laktoferyną. W Stanach Zjednoczonych i w Japonii mieszanki takie są już dostępne na rynku (44).

1. 2. 6. Stężenie laktoferyny we krwi i innych płynach ustrojowych

Laktoferyna obecna jest w wielu płynach ustrojowych. Występuje we krwi, mleku, moczu, ślinie, łzach oraz wydzielinie błony śluzowej nosa, oskrzeli, pochwy, macicy, przewodu pokarmowego, w płynie nasiennym, żółci, maziówce, płynie mózgowo-rdzeniowym i w płynie owodniowym (43). Obecność laktoferyny można stwierdzić także w kale. Stężenie w osoczu jest stosunkowo niskie w porównaniu np. ze stężeniem

w mleku, w wydzielinie oskrzeli, nosa czy w nasieniu. Dość wysokie stężenia stwierdza się we łzach i w wydzielinie z pochwy (43).

Źródłem laktoferyny w osoczu są ziarnistości drugorzędowe granulocytów obojętnochłonnych. Według wielu badań stężenie laktoferyny we krwi zwykle koreluje z liczbą granulocytów obojętnochłonnych. Dotychczas nie określono jednoznacznie wartości referencyjnych stężenia laktoferyny we krwi. Wiadomo, że w stanie zdrowia utrzymywane jest stałe, stosunkowo niskie jej stężenie. Wzrasta ono w stanach zapalnych związanych z naciekiem i rozpadem granulocytów oraz w przewlekłych chorobach zapalnych i w chorobie nowotworowej (43). W dostępnym piśmiennictwie prezentowany jest stosunkowo szeroki zakres normy w osoczu (od 0,01 µg/mL do 3,5 µg/mL). Jednak obserwowane różnice wynikają najpewniej z różnej metodologii oznaczania poziomu laktoferyny we krwi. Wykazano ponadto dodatnią korelację poziomu laktoferyny we krwi kobiet ciężarnych z czasem trwania ciąży (7). Prawdopodobnie związane jest to z obserwowaną w ciąży leukocytozą oraz z wytwarzaniem laktoferyny przez doczesną (7). Badania dotyczące poziomu laktoferyny u dzieci wykazały, iż najwyższe wartości notuje się w okresie noworodkowym. Natomiast od około 15 tygodnia życia wartości zbliżone są do obserwowanych u ludzi dorosłych. Najprawdopodobniej stwierdzaną tendencję można tłumaczyć wysokim stężeniem laktoferyny we krwi pępowinowej (44).

W mleku notuje się stosunkowo wysokie stężenia laktoferyny, przy czym najwyższe w siarze. Interesujący jest fakt, że najwyższe poziomy tego białka stwierdza się w siarze matek, które urodziły przedwcześnie (7).

1. 2. 7. Przydatność diagnostyczna oznaczania stężenia laktoferyny w różnych materiałach biologicznych

1. 2. 7. 1. Laktoferyna w kale

Przydatność oznaczania poziomu laktoferyny w kale opisywana była już w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Laktoferyna, jako białko uwalniane głównie przez granulocyty obojętnochłonne, może być parametrem umożliwiającym różnicowanie stanu zapalnego jelita z zaburzeniami czynnościowymi jego funkcji. W 1994 roku *Miller i wsp.* opublikowali pracę, w której postulują, że pomiar stężenia laktoferyny w kale pozwala odróżnić biegunki przebiegające z nasilonym stanem

zapalnym jelita od tych, w których nie stwierdza się dużych nacieków z komórek zapalnych. Było to badanie prospektywne 26 ochotników, u których doświadczalnie indukowano biegunkę bakteryjną (45). Autorzy kolejnych doniesień podkreślali możliwość wykorzystania oznaczania stężenia laktoferyny w kale do różnicowania między biegunką o etiologii bakteryjnej i wirusowej, postulując wykorzystanie tego parametru w diagnostyce ostrych biegunek (46). *Choi i wsp.* przedstawili możliwość znacznego zmniejszenia kosztów diagnostyki ostrych biegunek poprzez wykonanie posiewu kału tylko u tych pacjentów, u których stwierdzono podwyższone stężenie laktoferyny w kale. Chorzy z podwyższonym stężeniem laktoferyny w kale stanowią grupę, u której należy rozważyć empiryczne leczenie antybiotykiem (47). Powyższe obserwacje zostały potwierdzone także w innych badaniach (48,49). Z pewną ostrożnością należy interpretować wyniki oznaczania stężenia laktoferyny w kale u niemowląt karmionych piersią, w związku z tym, iż otrzymują one dodatkowo laktoferynę z mlekiem matki (50)

Ocena przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale nadal jest przedmiotem wielu badań. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się pojedyncze doniesienia na temat podwyższonego stężenia laktoferyny w kale u chorych z NZJ. Autorzy ocenili korelację stężenia laktoferyny z poziomem innych, uprzednio już uznanych wskaźników, uwalnianych z granulocytów obojętnochłonnych. Laktoferyna została uznana za najlepszy marker stanu zapalnego (38). Laktoferyna jako parametr stanu zapalnego oznaczany w kale, ze względu na stosunkowo niską cenę i łatwość wykonania, wydaje się badaniem bardzo obiecującym w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu NZJ. Jednak doniesienia na ten temat w dostępnym piśmiennictwie są nieliczne (51,52,53), szczególnie dotyczące populacji dziecięcej (54).

Według części autorów oznaczanie stężenia laktoferyny może być traktowane jako badanie przesiewowe, służące do wstępnej kwalifikacji pacjentów z dotychczas nierozpoznanym NZJ do przeprowadzenia poszerzonej diagnostyki (55). Inne doniesienia sugerują, iż to proste badanie może być przydatne w różnicowaniu NZJ i zespołu jelita drażliwego. Dolegliwości w zespole jelita drażliwego są przewlekłe i różnorodne: bóle brzucha, biegunka lub zaparcia czy brak apetytu. Chorzy poddawani są często licznym, specjalistycznym badaniom dodatkowym, w tym także kolonoskopii. Stężenie laktoferyny w kale u tych pacjentów jest porównywalne z wartościami obserwowanymi u ludzi zdrowych. Wydaje się zatem, że być może oznaczanie stężenia

laktoferyny w kale pozwoli na rezygnację z kosztownej i często obciążającej diagnostyki (56).

Także u chorych z zespoleniem krętniczo-odbytniczym z towarzyszącymi objawami ze strony przewodu pokarmowego (biegunka, bóle brzucha) w różnicowaniu zastosowanie znalazło oznaczanie laktoferyny w kale. Wykazano bowiem korelację poziomu tego białka w kale z nasileniem procesu zapalnego (57).

Niektórzy autorzy podkreślają przydatność oznaczania laktoferyny także w badaniach przesiewowych w kierunku nowotworów oraz polipów jelita grubego. Ocenia się, że wartość tego badania jest porównywalna z oceną obecności krwi utajonej w kale (58,59). Pojedyncze doniesienia poruszają temat użyteczności powyższego testu w ocenie stanu zapalnego błony śluzowej prostnicy, spowodowanego promieniowaniem jonizującym w przebiegu radioterapii (60).

1. 2. 7. 2. Laktoferyna w płynie mózgowo-rdzeniowym

Laktoferyna, jako białko wydzielane przez granulocyty obojętnochłonne, tkanki gruczołowe oraz komórki mikrogleju, obecna jest także w płynie mózgowo-rdzeniowym. W chorobach przebiegających z uszkodzeniem bariery krew-mózg stężenie tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym wzrasta. Dotyczy to między innymi takich stanów klinicznych, jak krwawienie podpajęczynówkowe czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Uszkodzenie bariery krew-mózg obserwowane jest także w chorobach neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Alzheimera (37).

1. 2. 7. 3. Oznaczanie poziomu laktoferyny w moczu

Pojedyncze dane z piśmiennictwa sugerują wykorzystanie oceny poziomu laktoferyny w moczu jako markera infekcji dróg moczowych. W roku 1999 naukowcy japońscy opublikowali doniesienie oparte o badanie pacjentów z zakażeniami dróg moczowych o etiologii bakteryjnej, u których oznaczano stężenie laktoferyny w moczu. Czulość i swoistość testu wyniosły odpowiednio 93,3% i 89,3% (61).

1. 2. 8. Wykorzystanie laktoferyny w leczeniu

W związku z przeciwbakteryjnym i przeciwnowotworowym działaniem laktoferyny podejmowano próby jej leczniczego wykorzystania.

Di Mario i Okuda i wsp. w grupie pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori* wykazali, że dodatkowe zastosowanie bydłcej laktoferyny zdecydowanie zwiększało odsetek chorych, u których uzyskano eradykację tego drobnoustroju (62,63).

Podobne badania przeprowadzono z użyciem hodowli komórek nowotworowych lub modeli zwierzęcych zawierających komórki nowotworowe. Dodawano laktoferynę, uzyskując znaczące zahamowanie wzrostu patologicznej tkanki (64). Jednak do chwili obecnej istnieją pojedyncze doniesienia dotyczące podawania laktoferyny pacjentom z chorobą nowotworową. W 2006 roku *Hayes i wsp.* opublikowali badanie kliniczne, w którym pacjentom ze skrajnie zaawansowaną chorobą nowotworową podawano laktoferynę. U 7 z 10 badanych obserwowano zmniejszenie masy guza, a cała grupa chorych przeżyła przynajmniej rok od momentu zastosowania laktoferyny (42).

1. 3. Nieswoiste zapalenia jelit

1. 3. 1. Wprowadzenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) to choroby, których istotą jest przewlekły proces zapalny jelita. Do najczęściej rozpoznawanych należą: choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Schorzenia te charakteryzują się wieloletnim przebiegiem, z okresami zaostrzeń i remisji. Dotychczas etiologia NZJ nie została ostatecznie ustalona. W ostatnich latach stale wzrasta liczba pacjentów, u których rozpoznaje się NZJ.

1. 3. 2. Epidemiologia

Częstość NZJ u dzieci jest dość wysoka i obserwuje się stałą tendencję wzrostową liczby zachorowań w tej grupie wiekowej (65). Pacjenci pediatryczni (od 0 do 18 roku życia) stanowią około 30% wszystkich chorych z NZJ (65). Częstość występowania wykazuje duże zróżnicowanie geograficzne. Najwięcej zachorowań notuje się w Europie, Ameryce Północnej i Australii (65), natomiast niska zachorowalność występuje w krajach Ameryki Południowej, Azji Południowej, Afryki z wyjątkiem RPA (66). Najwyższe wskaźniki częstości występowania mają miejsce w krajach wysoko rozwiniętych, natomiast w obszarach rozwijających się odsetek zachorowań na NZJ jest znacznie niższy (65). Prawdopodobnie dominują tam zapalenia jelit o etiologii

infekcyjnej. Jednak dane pochodzące z tych krajów są niepełne i być może mamy do czynienia ze zjawiskiem zbyt niskiej rozpoznawalności. W Europie najwyższa częstość występowania NZJ u dzieci jest notowana w Szwecji, w rejonie Sztokholmu: 10,5 nowych rozpoznań na 100 000 dzieci (67), a w większości krajów waha się pomiędzy 2 a 6 (68,69,70). Dane pochodzące z Europy Wschodniej są, w porównaniu z Europą Zachodnią, niepełne. Większość z nich dotyczy populacji dorosłych, jednak i w tej grupie odnotowano wzrost zachorowań (71). Aktualne badania dotyczące dzieci pochodząca z Czech. Wykazano w nich wzrost częstości występowania choroby Leśniowskiego-Crohna z 0,25 w 1990 roku do 1,25 na 100 000 dzieci poniżej 15 roku życia w 2001 roku (72). Dane na temat zachorowań dzieci polskich wydają się również niepełne. Ostatnie pochodzą z lat 2002-2004, gdzie obserwowana częstość zachorowań na NZJ wynosiła 1,22 na 100 000 dzieci i młodzieży do 18 r.ż. (73).

1. 3. 3. Etiologia

Jak dotychczas etiopatogeneza NZJ nie jest w pełni wyjaśniona. Pod uwagę bierze się zaburzenia immunologiczne, czynniki infekcyjne, wpływ niektórych leków, czynniki genetyczne oraz środowiskowe.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w krajach Europy i Ameryki Północnej obserwuje się zmianę profilu chorób występujących u dzieci. Do lat osiemdziesiątych XX wieku dominowały schorzenia infekcyjne. Obecnie notuje się wzrost częstości występowania chorób o podłożu autoimmunologicznym oraz przewlekłych schorzeń zapalnych (74). Podejmowane są liczne próby wyjaśnienia tego zjawiska. Najczęściej cytowana jest tzw. „hipoteza higieniczna”, wiążąca powyższe zmiany z polepszeniem warunków socjoekonomicznych, skutkującym małym kontaktem z antygenami bakteryjnymi w okresie dzieciństwa (74). Kolejnym czynnikiem środowiskowym mającym wpływ na występowanie NZJ jest palenie papierosów. Zwiększa ono ryzyko wystąpienia i zaostrzenia przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna, natomiast wykazuje działanie ochronne w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (75). Występowanie NZJ wydaje się mieć związek z karmieniem piersią, które ma działanie ochronne, związane z wpływem na rozwój układu immunologicznego w okresie wczesnego dzieciństwa (76).

Obecnie uważa się, że zasadniczą rolę w etiopatogenezie NZJ pełnią zaburzenia immunologiczne polegające na utracie równowagi między czynnikami prozapalnymi i

przeciwzapalnymi i nasilonej produkcji cytokin prozapalnych oraz zmianie w populacji limfocytów (76).

Według niektórych autorów zaburzenia w sferze psychicznej, takie jak: stres, obniżenie nastroju i depresja mogą mieć wpływ na ujawnienie się NZJ (76). Inni autorzy reprezentują pogląd, iż stres może jedynie modyfikować przebieg choroby (77).

Występowanie NZJ może mieć związek ze stosowaniem niektórych leków. Stwierdzono, że u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne ryzyko wystąpienia choroby Leśniowskiego-Crohna jest dwukrotnie wyższe (78). Natomiast niesteroidowe leki przeciwzapalne u pacjentów z NZJ zwiększają ryzyko zaostrzenia choroby (78).

W przeszłości etiologię NZJ wiązano z zakażeniem bakteryjnym. Najczęściej wymieniane drobnoustroje to: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Największe nadzieje związane z etiologią NZJ dotyczyły *Mycobacterium paratuberculosis*. Drobnoustrój ten był izolowany z biopłatów jelit u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Jednak podjęte próby leczenia przeciwpątkowego nie przyniosły oczekiwanych efektów (78).

Odrębny przedmiot badań stanowi rola, jaką może pełnić w etiologii NZJ flora bakteryjna jelit. Niektóre doniesienia wskazują na utratę przez układ immunologiczny tolerancji antygenów tych drobnoustrojów, czego konsekwencją może być rozwój przewlekłego stanu zapalnego (78).

Badania autorów skandynawskich wykazały zwiększoną zachorowalność na chorobę Leśniowskiego-Crohna u osób, które urodziły się w okresie trwania epidemii odrzy w Szwecji. Jednak hipoteza ta nie została potwierdzona przez innych autorów (79). Podobnie nie potwierdzono związku między wystąpieniem choroby Leśniowskiego-Crohna a zastosowaniem w dzieciństwie poliwalentnego szczepienia przeciw odrze, śwince i różyczce, zawierającego żywe, atenuowane wirusy (76).

W etiologii NZJ istotną rolę pełnią aspekty genetyczne. Od dawna znana jest zwiększona zachorowalność na NZJ u krewnych pierwszego stopnia (76). Szczególnym przykładem są zachorowania u bliźniąt jednojajowych. Wydaje się, że NZJ są chorobami poligenowymi. Opiszano już kilkanaście *loci*, których geny mogą mieć wpływ na rozwój NZJ. Znajdują się na chromosomach: 16 – IBD1, 12 – IBD2, 6 – IBD3, 14 – IBD4, 5 – IBD5, 19 – IBD6, 1 – IBD7, 16 – IBD8 oraz na 3 – IBD9 (76). Szereg publikacji dotyczy roli, jaką pełni w etiopatogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna gen NOD2/CARD15, zlokalizowany na chromosomie 16. Badania wskazują, że

u nosicieli tego genu zaburzona jest równowaga między ciągłością błony śluzowej jelita a florą bakteryjną jelit (80).

Wśród innych czynników mogących mieć znaczenie w etiopatogenezie NZJ wymienia się zaburzenia przepuszczalności jelitowej. Zwiększenie przepuszczalności jelitowej jest wykładnikiem zaburzenia integralności błony śluzowej jelita (81). Część autorów jest zgodna, że zwiększenie przepuszczalności jelitowej uwarunkowane jest genetycznie i poprzedza wystąpienie choroby Leśniowskiego-Crohna (82). Natomiast według innych naukowców zwiększenie przepuszczalności jelitowej jest jedynie skutkiem toczącego się w jelicie stanu zapalnego. W procesie tym pod wpływem TNF- α (czynnik martwicy guza α) dochodzi do rozszczelnienia tzw. „tight junctions” (83). Ocena przepuszczalności jelitowej mogłaby więc być jedynie przydatna w ocenie przebiegu NZJ. Wykazano, że nawrót choroby poprzedzony jest zwiększeniem przepuszczalności jelitowej (84).

1. 3. 4. Obraz kliniczny

Obraz kliniczny NZJ jest złożony i z tego powodu postawienie ostatecznego rozpoznania może być trudne.

Główne objawy choroby Leśniowskiego-Crohna to przewlekłe bóle brzucha, biegunka oraz utrata masy ciała. U dzieci początek choroby może być podstępny. Dominować mogą przewlekłe stany gorączkowe, apatia, niechęć do jedzenia, błądź powłok skórnych. Utracie masy ciała towarzyszy zwykle opóźnione wzrastanie oraz opóźnione dojrzewanie płciowe. Rzadziej występujące objawy to: rumień guzowaty, artropatia oraz nawracające afty w jamie ustnej (85).

Obraz kliniczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest bardziej charakterystyczny niż choroby Leśniowskiego-Crohna. Najczęściej występujące objawy to biegunka i krwawienie z dolnego odcinka przewodu pokarmowego. U znacznej liczby pacjentów rozpoznawana jest niedokrwistość niedoborowa. Objawy takie jak bóle brzucha występują u około 50% chorych, a utrata masy ciała u około 30% (85).

Ciężki przebieg choroby może wystąpić zarówno u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Najczęściej ma miejsce w początkowym etapie choroby, przed ustaleniem ostatecznego rozpoznania (85).

1. 3. 5. Zmiany morfologiczne w obrębie przewodu pokarmowego

Zmiany morfologiczne w chorobie Leśniowskiego-Crohna najczęściej zlokalizowane są w okolicy zastawki krętniczo-kątniczej, w jelicie grubym, rzadziej w postaci izolowanej w końcowym odcinku jelita cienkiego. Wiadomo jednak, że w chorobie Leśniowskiego-Crohna mogą występować w całym przewodzie pokarmowym. Zmiany te mają charakter segmentarny, tzn. odcinki zmienione chorobowo sąsiadują z odcinkami makroskopowo niezmienionymi (85).

W obrazie makroskopowym jelita najczęściej jest stwierdzana powiększona grudka chłonna otoczona rumieniem. Może ona przekształcić się w tzw. owrzodzenie aftowe. W miarę zaawansowania procesu chorobowego w jelicie mogą powstać głębokie szczelinowate owrzodzenia. Inne zmiany typowe dla choroby Leśniowskiego-Crohna to zwężenie jelita, ropnie okołojelitowe i przetoki.

Proces chorobowy w chorobie Leśniowskiego-Crohna obejmuje wszystkie warstwy błony śluzowej jelita (85). Badanie mikroskopowe bioptatu jelita ujawnia obecność nacieków z komórek zapalnych (limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych) oraz przewlekłej ziarniny z wielojądrowymi komórkami olbrzymimi (85).

Zmiany morfologiczne we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego są zlokalizowane najczęściej w odbytnicy, zstępnicy, rzadziej w całym jelicie grubym. Mają one charakter ciągły. W obrazie makroskopowym jelita stwierdzone jest przekrwienie, utrata rysunku naczyniowego, ziarninowanie, obecność krwisto-ropnej wydzieliny na powierzchni błony śluzowej oraz rozległe owrzodzenia. W badaniu mikroskopowym bioptatu jelita uwidaczniany jest proces zapalny, reprezentowany przez nacieki składające się z granulocytów obojętnochłonnych. Ponadto są obecne mikroropnie w kryptach jelitowych, charakterystyczne dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (85).

1. 3. 6. Diagnostyka

Diagnostyka NZJ obejmuje wywiad, badanie fizykalne oraz badania dodatkowe. Do podstawowych badań laboratoryjnych wykonywanych w procesie diagnostycznym NZJ należą: morfologia krwi obwodowej, wzór odsetkowy krwinek białych, odczyn opadania krwinek czerwonych (OB) oraz stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w

surowicy krwi. *Vermeire i wsp.* uważają, że CRP zwłaszcza w chorobie Leśniowskiego-Crohna jest dobrym wykładnikiem stanu zapalnego i jest użyteczne w różnicowaniu oraz monitorowaniu przebiegu choroby (86).

Liczba krwinek białych i płytek krwi są także uznanymi parametrami stanu zapalnego. Jednak są to parametry wysoce nieswoiste i z tego względu ich przydatność kliniczna w NZJ jest ograniczona. Ponadto leukocytoza może być efektem stosowania terapii kortykosteroidami (85).

Kolejne badania laboratoryjne wykonywane w NZJ to oznaczenie stężenia białka całkowitego, albumin, żelaza oraz fibrynogenu (85).

W początkowym etapie leczenia NZJ, a zwłaszcza choroby Leśniowskiego-Crohna, celem wykluczenia choroby trzewnej, konieczne jest oznaczenie stężenia przeciwciał przeciw endomysium mięśni gładkich (85).

W celu różnicowania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego z chorobą Leśniowskiego-Crohna oznacza się poziom przeciwciał przeciw *Saccharomyces cerevisiae* i przeciwciał przeciw okołojądrowemu antygenowi granulocytów (pANCA). Pierwsze charakterystyczne są dla choroby Leśniowskiego-Crohna, natomiast drugie dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (85).

Kolejnym etapem w diagnostyce NZJ jest badanie kolonoskopowe, pozwalające na zobrazowanie błony śluzowej jelita grubego i końcowego odcinka jelita cienkiego. Badania endoskopowe umożliwiają ponadto pobranie bioptatów błony śluzowej jelita, koniecznych do wykonania badania histopatologicznego (85).

Inne badania, które ze względu na narażenie na promieniowanie rentgenowskie są rzadziej przeprowadzane w NZJ, to badania radiologiczne. Wśród nich wymienić należy zdjęcie przeglądowe jamy brzusznej oraz badania przewodu pokarmowego z użyciem kontrastu (85).

Niezwykle użyteczne w NZJ jest także badanie sonograficzne jamy brzusznej. Oprócz oceny lokalizacji narządów jamy brzusznej oraz potwierdzenia obecności tworów patologicznych, takich jak guzy czy ropnie, badanie to umożliwia pomiar grubości ściany jelita (85).

Ze względu na stosunkowo rzadkie występowanie NZJ u małych dzieci konieczne jest wykluczenie szeregu innych chorób. W różnicowaniu z NZJ brane są przede wszystkim pod uwagę choroby infekcyjne, wywoływane przez takie drobnoustroje, jak: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Amoeba*, *Mycobacterium*

tuberculosis, Clostridium, Giardia lamblia oraz celiakia i alergia na białko mleka krowiego (85).

Wszyscy pacjenci z rozpoznaniem NZJ powinni pozostawać pod stałą opieką specjalistyczną. Podstawowe badania, które są pomocne w monitorowaniu przebiegu choroby to: morfologia krwi obwodowej, CRP i OB. W praktyce codziennej często wykonywane jest badanie stolca na obecność krwi utajonej. Jest to parametr nieswoisty, jednak ze względu na to, że ma charakter nieinwazyjny, oznaczenie to jest niezwykle cenne.

Obecnie szereg doniesień wskazuje na rolę, jaką mogą pełnić w przyszłości parametry „stanu zapalnego” oznaczane w stolcu. Parametry te są niezwykle czułe, ponieważ ich wahania odzwierciedlają dynamikę procesu zapalnego jedynie w obrębie jelita. Dobrze udokumentowana jest praktyczna przydatność oznaczania w kale stężenia: kalprotektyny, alfa1-antytrypsyny, lizozymu, mieloperoksydazy i elastazy granulocytów obojętnochłonnych (86). W piśmiennictwie dostępne są pojedyncze doniesienia dotyczące oznaczania stężenia laktoferyny w kale (51,52,53,54). Wprowadzenie dodatkowego parametru umożliwiającego monitorowanie przebiegu NZJ, a oznaczanego w tak dostępnym materiale biologicznym, jakim jest stolec, będzie niezwykle cenne zwłaszcza u dzieci.

1. 3. 7. Powikłania nieswoistych zapaleń jelit

NZJ obarczone są ryzykiem wystąpienia licznych powikłań. Najczęściej wymieniane to: przetoki jelitowo-jelitowe, jelitowo-skinne, zwężenia jelita w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz perforacja jelita i toksyczne zapalenie jelita grubego w wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Inne poważne powikłania mogą być efektem leczenia immunosupresyjnego (86). Wieloletni stan zapalny, zwłaszcza u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, może doprowadzić do rozwoju raka jelita grubego (85).

1. 3. 8. Leczenie

Leczenie NZJ powinno być prowadzone przez zespół terapeutyczny, w skład którego wchodzi: gastroenterolog, pediatra, dietetyk, psycholog, chirurg oraz lekarz pierwszego kontaktu (87).

Podstawowe zasady leczenia obejmują: szybkie ustalenie rozpoznania, poinformowanie pacjenta i rodziny o istocie choroby, leczenie doprowadzające do remisji, utrzymanie remisji, odpowiednie postępowanie żywieniowe oraz minimalizowanie efektów ubocznych leczenia. U dzieci niezwykle istotne jest zapewnienie prawidłowego wzrastania i dojrzewania płciowego oraz opieka psychologiczna i kontynuowanie edukacji szkolnej przez dziecko (87).

W aktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna stosuje się glikokortykosteroidy oraz kilkutygodniowe żywienie enteralne z zastosowaniem diet przemysłowych. W celu utrzymania remisji choroby podawane są 5-aminosalicylany (sulfasalazyna, mesalazyna), a w postaciach opornych na leczenie stosuje się azatioprynę, 6-merkaptopurynę oraz metotreksat. Inne leki z grupy ingerujących w odpowiedź immunologiczną to cyklosporyna, takroimus i wprowadzone ostatnio do leczenia przeciwciała przeciw czynnikowi martwicy guza α (TNF- α) - infliximab (86). W chorobie Leśniowskiego-Crohna leczenie chirurgiczne podejmowane jest tylko wówczas, gdy występują poważne powikłania choroby. Główne wskazania do tej formy terapii to: zwężenie jelita i zaburzenia pasażu, ropień w jamie brzusznej oraz przetoki międzypętlowe lub jelitowo-skinne (85).

Leczenie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest zasadniczo podobne do leczenia choroby Leśniowskiego-Crohna. W ciężkich postaciach stosuje się krótkotrwałe żywienie pozajelitowe oraz glikokortykosteroidy. W leczeniu postaci łagodnych i średnio zaawansowanych znajdują zastosowanie 5-aminosalicylany. Sporadycznie do terapii wprowadza się azatioprynę i 6-merkaptopurynę a wyjątkowo rzadko cyklosporynę i takrolimus. Coraz częściej podejmowane są próby leczenia infliximabem. Leczenie chirurgiczne wrzodziejącego zapalenia jelita grubego podejmowane jest z kilku przyczyn: przede wszystkim w przypadkach opornych na dotychczasowe leczenie farmakologiczne, a ponadto z powodu wystąpienia powikłań choroby, takich jak: perforacja przewodu pokarmowego, krwawienie z przewodu pokarmowego czy dysplazja i rak jelita grubego w późniejszym etapie choroby (86).

Wobec niezwykle złożonej oraz dotychczas nie w pełni wyjaśnionej etiologii NZJ, często ciężkiego lub nietypowego obrazu klinicznego choroby, skomplikowanego procesu diagnostycznego, a przede wszystkim braku prostych parametrów umożliwiających monitorowanie przebiegu choroby, w niniejszej pracy podjęto próbę oceny przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale u dzieci z NZJ.

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale jako wykładnika nasilenia procesu zapalnego u dzieci i młodzieży z nieswoistymi zapaleniami jelit.

Cele szczegółowe to:

- Ocena przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale jako parametru pozwalającego na rozpoznanie stanu zapalnego jelit.
- Ocena przydatności oznaczania stężenia laktoferyny w kale jako markera aktywności zapalnej u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit z różnym stopniem zaawansowania klinicznego i endoskopowego choroby.
- Porównanie stężenia laktoferyny w kale z innymi, uznanymi markerami stanu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit.
- Dodatkowym celem pracy było ustalenie wartości referencyjnych stężenia laktoferyny w kale dla wieku rozwojowego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pacjenci i grupa porównawcza

Badaniami objęto 101 dzieci, w tym 48 dziewcząt (48,5%) i 53 chłopców (52,5%). Wśród badanych było 24 (23,7%) pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz 28 (27,7%) dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, u 5 dzieci (5,0%) rozpoznano zapalenie błony śluzowej proctnicy, a u 3 (3,0%) niespecyficzne zapalenie błony śluzowej jelita grubego. Od dzieci chorych pobrano łącznie 123 próbki kału. Pozostałych 41 badanych (40,59%) stanowiło grupę porównawczą, do której zakwalifikowano 23 dzieci zdrowych (56,1%) oraz 18 dzieci (43,9%) diagnozowanych lub leczonych z powodu niezapalnych chorób przewodu pokarmowego (zwiększenie niezapalne przełyku - 2 dzieci, obciążony wywiad nowotworowy w rodzinie (rak jelita grubego u krewnych pierwszego stopnia) - 2 dzieci, bóle brzucha o etiologii czynnościowej - 14 dzieci). Wszyscy pacjenci pozostawali pod stałą opieką Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Poradni Gastroenterologii Dziecięcej przy Pomorskim Centrum Traumatologii w Gdańsku w latach 2005-2008.

3.2. Badania dodatkowe

U wszystkich dzieci przeprowadzono szczegółowe badanie podmiotowe i przedmiotowe.

W wywiadzie analizowano przede wszystkim: bóle brzucha, złe samopoczucie, gorączkę, liczbę wypróżnień w ciągu doby, charakter oddawanych stolców (płynne, półpłynne, stałe, obecność śluzu i/lub krwi) oraz uczucie parcia na stolec.

Poza badaniem fizykalnym wykonano pomiary antropometryczne (wzrost, masa ciała). U każdego pacjenta obliczono wskaźnik Cole'a według następującego wzoru (88):

$$\text{Wsk. Cole'a (\%)} = [\text{masa ciała} \times \text{długość standardowa ciała}^2 / \text{standardowa masa ciała} \times \text{długość ciała}^2] \times 100$$

U wszystkich dzieci chorych wykonano następujące badania laboratoryjne:

- morfologię krwi obwodowej ze wzorem odsetkowym krwinek białych,
- oznaczenie bezwzględnej liczby granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej,
- odczyn opadania krwinek czerwonych (OB),
- stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi,
- stężenie fibrynogenu w osoczu,
- badanie kału na obecność krwi utajonej.

Morfologia z oceną wzoru białokrwinkowego została wykonana metodą konduktometryczną. Odczyn sedymentacji krwinek czerwonych (OB) został wykonany metodą tradycyjną. Stężenie białka C-reaktywnego oznaczono metodą immunoturbidymetryczną, za pomocą testu lateksowego. Stężenie fibrynogenu wykonano metodą Claussa.

Badanie na obecność krwi utajonej w kale wykonano przy użyciu testu jakościowego, opartego o metodę immunochromatograficzną. Otrzymane wyniki interpretowano jako ujemne lub dodatnie.

Wszystkie wyżej wymienione badania wykonano w ramach rutynowej diagnostyki i nie był w tym celu pobierany dodatkowo materiał biologiczny.

U 47 badanych pacjentów, zgodnie z algorytmem postępowania diagnostycznego, wykonano 65 badań kolonoskopowych. W grupie tej było 18 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 22 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, 5 z zapaleniem błony śluzowej prostnicy i 2 z niespecyficznym zapaleniem błony śluzowej jelita grubego. Badanie przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym, wykonywano je w Pracowni Endoskopii Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Akademii Medycznej w Gdańsku, endoskopem OLYMPUS PCF-16OAL. Żaden z badających endoskopistów nie znał stężenia laktoferyny w kale u poszczególnych badanych. Oceniano obraz makroskopowy błony śluzowej jelita grubego i końcowego odcinka jelita cienkiego. Zmiany klasyfikowano według czterostopniowej skali zaawansowania zmian zapalnych zaproponowanej przez *Langhorsta i wsp.* (Tabela 1) (89).

Tabela 1

Zaawansowanie zmian makroskopowych w endoskopii

Liczba punktów	Zmiany makroskopowe
0	Prawidłowy obraz
1	Rumień, zmniejszenie lub zniesienie rysunku naczyniowego, kruchość błony śluzowej, obecność pojedynczych aft
2	Obecność licznych aft i małych owrzodzeń
3	Obecność dużych owrzodzeń, spontaniczne krwawienie, grudki, zwężenie światła jelita

3.3. Wskaźniki aktywności choroby

Przeprowadzone badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz badania dodatkowe umożliwiły wyznaczenie Pediatrycznego Indeksu Aktywności w chorobie Leśniowskiego-Crohna (PCDAI – *Pediatric Crohn's Disease Activity Index* w modyfikacji Ryżki) i indeksu Truelove-Wittsa (w modyfikacji Ryżki) we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (załącznik 1,2).

3.4. Oznaczanie laktoferyny w kale

Próbki materiału biologicznego były pobierane do plastikowych pojemników przeznaczonych do pobierania stolca. Następnie były one zamrażane do temperatury -72°C i w tych warunkach przechowywane do chwili wykonywania oznaczeń. Oznaczenia stężenia laktoferyny w kale dokonano przy użyciu komercyjnego testu IBD-SCAN™ (TECHLAB, numer katalogowy 30351). Jest to test immunoenzymatyczny umożliwiający oznaczenia ilościowe. Istota badania polega na łączeniu się przeciwciał przeciw ludzkiej laktoferynie, zawartych w teście, z laktoferyną obecną w pobranej próbce stolca. Procedura przebiega w kilku etapach. Pierwszy to

rozrożnienie badanego materiału i jego rozcieńczenie (używano następujących rozcieńczeń – 1:100, 1:400, 1:1000, 1:4000). Następnie przygotowane roztwory przenoszono do studzienek mikrotitracyjnych, zawierających unieruchomione, poliklonalne przeciwciała przeciw ludzkiej laktoferynie. W czasie 30 minutowej inkubacji laktoferyna obecna w badanym materiale biologicznym wiązała się z unieruchomionymi w dołkach przeciwciałami. Kolejny etap to płukanie studzienek i dodanie koniugatu, który zawierał poliklonalne, królicze przeciwciała przeciw ludzkiej laktoferynie, sprzężone z peroksydazą chrzanową. Po kolejnej, 30 minutowej inkubacji, ponownie płukano płytkę. W ten sposób powstawała warstwowa struktura składająca się z przeciwciał przeciw laktoferynie opłaszczających płytkę, laktoferyny pochodzącej z badanego materiału lub dodatniej kontroli standardowych rozcieńczeń i przeciwciał skoniugowanych z peroksydazą chrzanową. W końcowym etapie, po kolejnym płukaniu, dodawano substrat w postaci tetrametylobenzydyny. Prowadziło to do reakcji katalizowanej przez peroksydazę chrzanową, w wyniku której bezbarwna tetrametylobenzydyna przechodziła w produkt o niebieskiej barwie. W kolejnym etapie dodawano kwas siarkowy, który zatrzymywał reakcję katalizowaną przez peroksydazę chrzanową i zmieniał barwę roztworu na żółtą. Nasilenie zabarwienia było określane ilościowo jako pomiar gęstości optycznej przy absorpcji maksymalnej 450 nm na czytniku mikroplatek ELISA. W zależności od stężenia laktoferyny dochodziło do powstania różnej intensywności zabarwienia uzyskanego roztworu. Podczas wykonywania testu do studzienek dodawano także roztwory standardowe (roztwory laktoferyny o stężeniach 6,25 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). Na podstawie znanych stężeń roztworów wykreślono krzywą kalibracyjną, której rzędna to stężenia laktoferyny (znane z roztworów standardowych), a odcięta to wartości zmierzonej dla tych stężeń laktoferyny absorbancji. Ostatecznie dokonywany był pomiar absorbancji roztworów badanych, powstałych przez rozcieńczenie analizowanego materiału. Pojedynczy pomiar stężenia laktoferyny oznaczany był po naniesieniu zmierzonej absorbancji na krzywą kalibracyjną i odczytanie odpowiadającego jej wyniku. Poprawność wykonanych oznaczeń była sprawdzana w oparciu o roztwory pozytywnej i negatywnej kontroli (zamieszczone w komercyjnym zestawie). Pomiaru gęstości optycznej dokonano przy użyciu czytnika ELizaMatTM 3000.

Według zaleceń producenta testu (firma Techlab) wartości od 0 do 7,24 $\mu\text{g/g}$ (ml) stolca uznawane są u dorosłych za normę, natomiast poziomy laktoferyny $\geq 7,25$ $\mu\text{g/g}$ (ml) interpretuje się jako podwyższone.

Materiał biologiczny (kał) został pobrany i analizowany po uzyskaniu pisemnej zgody rodziców lub opiekunów badanych pacjentów. Pozostałe badania zostały wykonane w trakcie koniecznej diagnostyki i terapii pacjentów leczonych w klinice. Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku wyraziła zgodę na przeprowadzenie niniejszej pracy (NKEBN/321/2004). W Aneksie załączono odpowiedni formularz (załącznik 3).

Oznaczenia stężenia laktoferyny w kale wykonano w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. Wiesława Łysiak-Szydłowska).

3. 5. Metody statystyczne

Wyniki badań, które uzyskano w niniejszej pracy poddano analizie statystycznej. Ocenę rozkładu parametrów liczbowych przeprowadzono w oparciu o test Kołmogorova-Smirnova. Parametry, które nie wykazywały cech rozkładu normalnego poddano transformacji logarytmicznej przed weryfikacją hipotez statystycznych. Porównanie pomiędzy kilkoma grupami zmiennych zależnych przeprowadzono metodą analizy wariancji z wykorzystaniem testu ANOVA Kruskala-Wallisa. Jeżeli test Anova wykazał różnice znamienne statystycznie, analizę kontrastów *post hoc* przeprowadzono z wykorzystaniem testu Scheffe'go. Dla porównania dwóch grup danych zebranych według modelu zmiennych niepowiązanych, dla pomiarów dokonanych w skali porządkowej stosowano test Manna-Whitneya. Na wykresach, w zależności od rozkładu parametru, przedstawiono średnią i odchylenia standardowe (SD) lub medianę, 25 i 75 centyl oraz zakres wartości. Zależność parametrów mierzonych w skali interwałowej przeprowadzono z wykorzystaniem testu korelacji rang Spearmana. W wynikach podano obliczone poziomy istotności weryfikowanych hipotez statystycznych, $p < 0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie.

Obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu oprogramowania statystycznego Statistica wersja 6.1 (StatSoft, Inc., USA) (90,91).

W celu ustalenia wartości referencyjnych testu diagnostycznego zastosowano metodę podwójnego odchylenia standardowego oraz wykreślono krzywą ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Krzywa ROC jest krzywą, która umożliwia ocenę zdolności testu do prawidłowego oddzielenia wyników prawidłowych i nieprawidłowych. W praktyce służy do porównania zdolności rozdzielczej testów. Wykres ilustruje zależność między czułością a dopełnieniem swoistości do wartości 1 (zakładając różne wartości progowe testu – *cut-off*) (92). Dla każdej krzywej ROC obliczono pole powierzchni pod krzywą (AUC – *Area Under the Curve*). Im wartość AUC bliższa jedności tym wyższa wartość diagnostyczna testu w rozróżnianiu osób zdrowych i chorych.

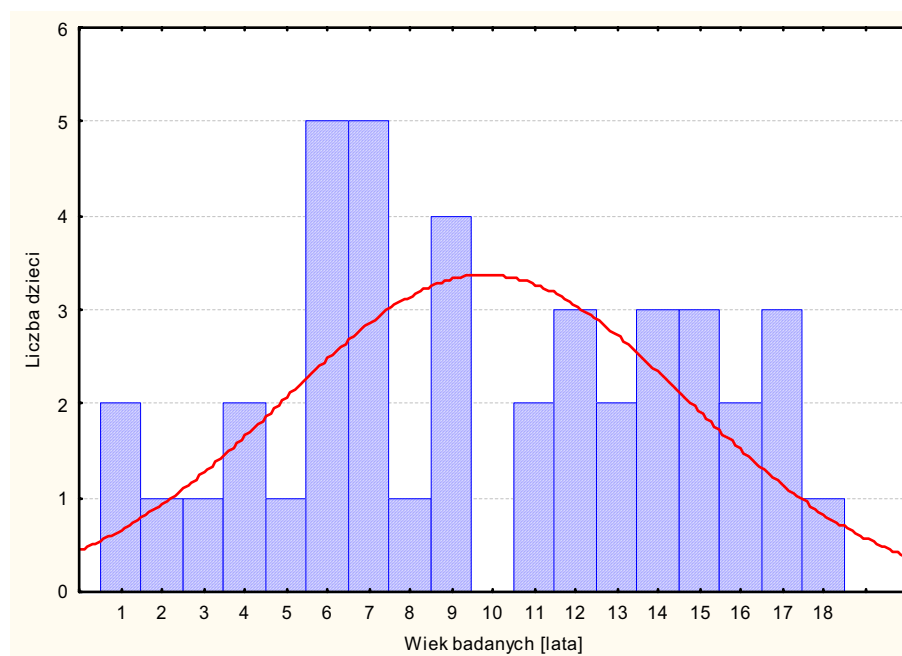
4. WYNIKI

4. 1. Wprowadzenie

Do badania zakwalifikowano 101 dzieci, w tym 60 dzieci chorych i 41 dzieci zaliczonych do grupy porównawczej. Analizie poddano ogółem 164 próbki kału, w tym w 95 przypadkach pobrane od chłopców (57,9%) i w 69 od dziewcząt (42,1%). Wśród 164 próbek, 123 pochodziły od dzieci chorych, a 41 od dzieci z grupy porównawczej. W grupie chorych, w 46 przypadkach (37,4%) materiał pochodził od dziewcząt, a w 77 przypadkach (62,6%) od chłopców.

4. 2. Grupa porównawcza

Grupa porównawcza składała się z 41 dzieci, 23 dziewcząt (56,1%) i 18 chłopców (43,9%), w wieku od 1 do 18 lat (średnia $9,8 \pm 4,9$ lat, mediana 9,0 lat). Nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy między wiekiem dzieci z grupy porównawczej a wiekiem dzieci chorych ($p > 0,05$). Na rycinie 1 przedstawiono rozkład wieku dzieci z grupy porównawczej, różnił się on statystycznie znamienne od rozkładu normalnego ($p < 0,001$).

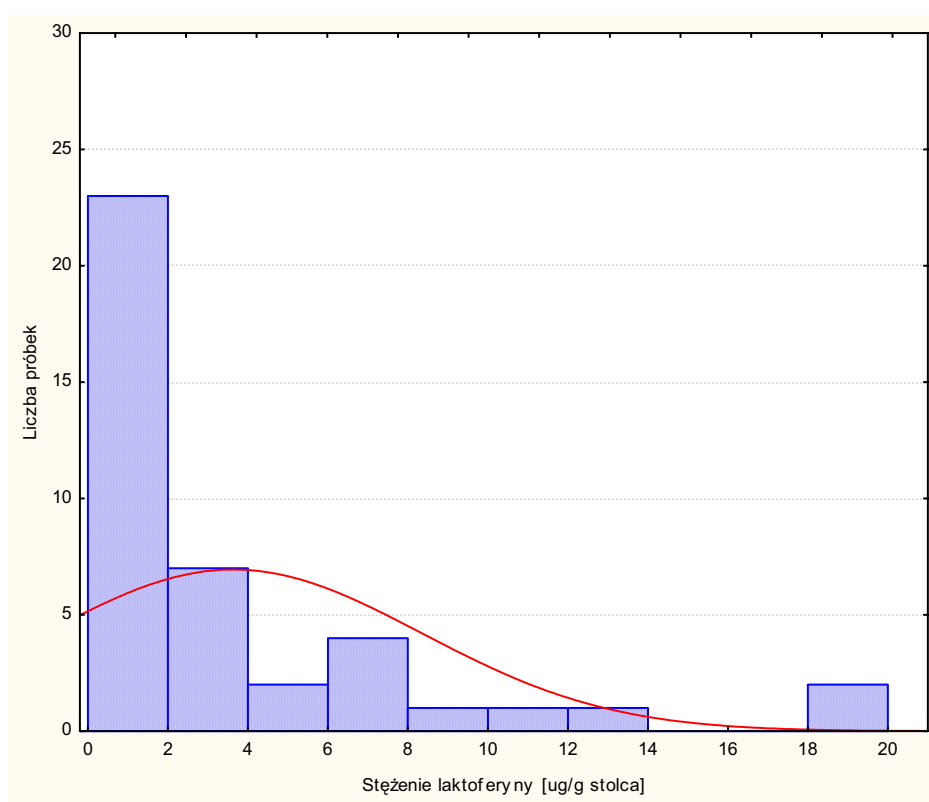


Rycina 1

Rozkład wieku dzieci z grupy porównawczej

Stężenie laktoferyny w kale u dzieci w grupie porównawczej mieściło się w zakresie wartości od 0,26 do 18,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $3,65 \pm 4,71$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 1,43 $\mu\text{g/g}$ stolca).

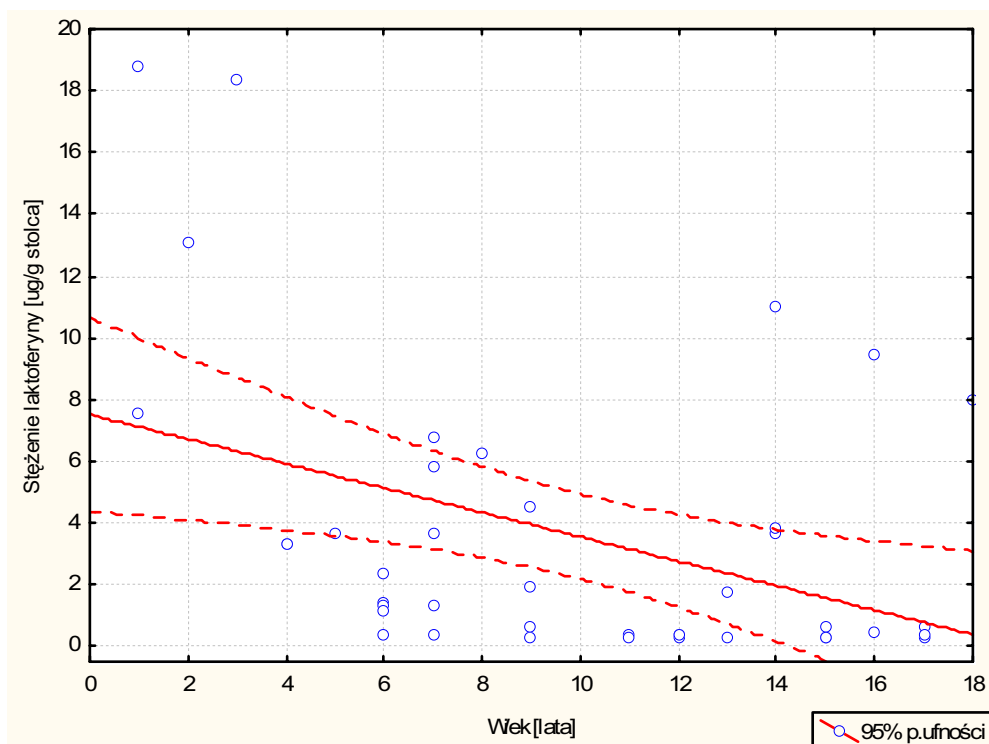
Szczegółowy rozkład stężenia laktoferyny w kale u dzieci w grupie porównawczej przedstawia rycina 2, różnił się on statystycznie znamienne od rozkładu normalnego ($p < 0,001$).



Rycina 2

Rozkład stężenia laktoferyny w kale u dzieci w grupie porównawczej

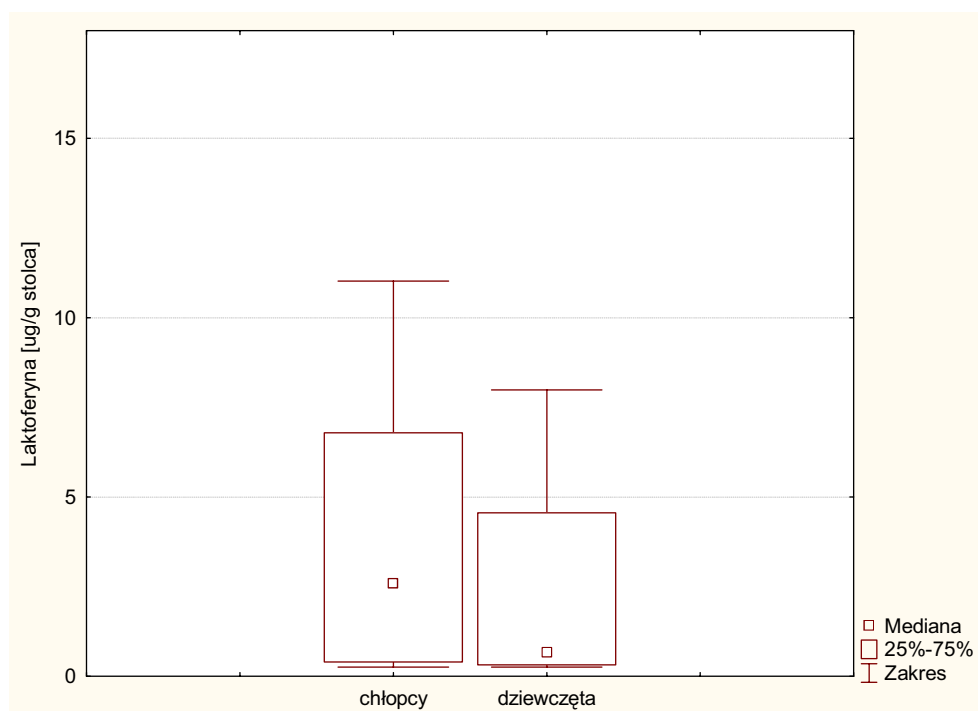
Następnie starano się ustalić czy istnieje zależność między stężeniem laktoferyny a wiekiem badanych dzieci. W grupie porównawczej nie obserwowano korelacji między stężeniem laktoferyny w kale i wiekiem badanych dzieci ($r = -0,41$), co przedstawiono graficznie na rycinie 3.



Rycina 3

Zależność stężenia laktoferyny w kale od wieku dzieci w grupie porównawczej ($r = -0,41$)

Analizowano także poziomy laktoferyny w kale w zależności od płci dzieci z grupy porównawczej. Stężenie laktoferyny w kale u dziewcząt w tej grupie mieściło się w zakresie wartości od 0,26 do 13,05 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $2,56 \pm 3,42$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 0,67 $\mu\text{g/g}$ stolca). Natomiast u chłopców wartości wahały się od 0,32 do 18,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $5,00 \pm 5,79$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 3,31 $\mu\text{g/g}$ stolca). W grupie porównawczej nie wykazano statystycznie istotnej różnicy stężenia laktoferyny w kale w zależności od płci badanych ($p = 0,082$). Próbę ustalenie powyższej zależności przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4

Wartości stężenia laktoferyny w kale w zależności od płci badanych w grupie porównawczej ($p=0,082$)

4. 3. Wartości referencyjne stężenia laktoferyny w kale

Na podstawie analizy wyników w grupie porównawczej, dla celów niniejszej pracy, ustalono wartości referencyjne dla stężenia laktoferyny w kale. Posłużono się metodą „średnia + 2 x odchylenie standardowe”. Dane niezbędne do obliczenia poziomu odcięcia (*cut-off*) zawiera tabela 2.

Tabela 2

Dane wykorzystane do obliczenia poziomu odcięcia

	Liczba dzieci	Średnie stężenie laktoferyny ($\mu\text{g/g}$ stolca)	SD	Średnia + 2xSD	<i>Cut-off</i>
Grupa kontrolna	41	3,65	4,71	13,07	13

Stężenie laktoferyny w kale wynoszące 13 $\mu\text{g/g}$ stolca przyjęto jako poziom odcięcia (*cut-off*). Na tej podstawie obliczono czułość i swoistość testu, wynoszące odpowiednio: 78,86% i 92,10%. Ponadto obliczono wartość predykcyjną testu dodatniego (PPV – *Positive Predictive Value*) oraz wartość predykcyjną testu ujemnego (NPV – *Negative Predictive Value*), które wyniosły odpowiednio 97,00% i 57,38%. Dane niezbędne do obliczenia powyższych wartości przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

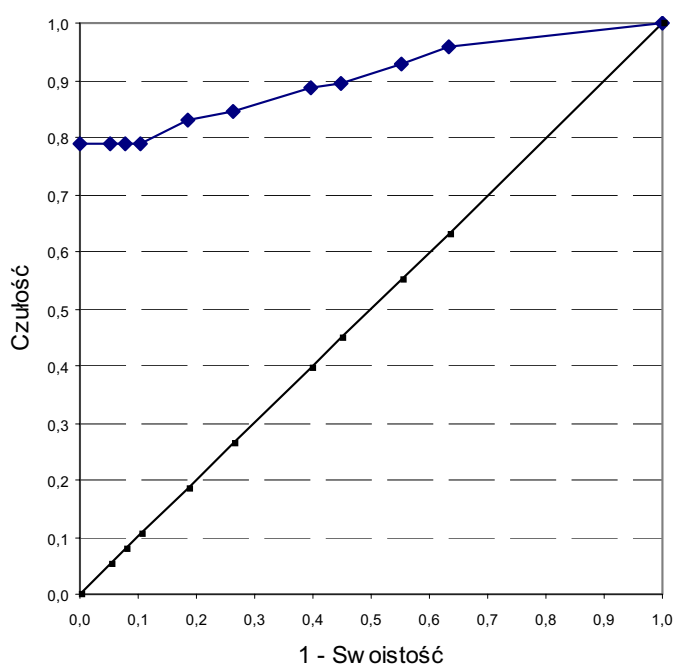
Dane niezbędne do obliczenia czułości, swoistości, PPV (wartość predykcyjna testu dodatniego) i NPV (wartość predykcyjna testu ujemnego) oznaczania stężenia laktoferyny w kale

	LICZBA PRÓBEK KAŁU		Ogółem
	Grupa dzieci chorych	Grupa porównawcza	
Stężenie laktoferyny w kale powyżej <i>cut-off</i> (13 $\mu\text{g/g}$ stolca)	97 (78,86%)	3 (7,31%)	100
Stężenie laktoferyny w kale poniżej <i>cut-off</i> (13 $\mu\text{g/g}$ stolca)	26 (21,14%)	38 (92,69%)	64
Ogółem	123	41	164

4. 4. Krzywa ROC

Krzywa ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) jest krzywą, która umożliwia ocenę zdolności testu do prawidłowego oddzielenia wyników mieszczących się w granicach normy i wyników nieprawidłowych. W praktyce służy do porównania zdolności rozdzielczej testów. Wykres ilustruje zależność między czułością a dopełnieniem swoistości do wartości 1 (zakładając różne wartości progowe testu – *cut-off*). Na rycinie 5 przedstawiono krzywą ROC dla oznaczania stężenia laktoferyny w kale u badanych w niniejszej pracy dzieci.

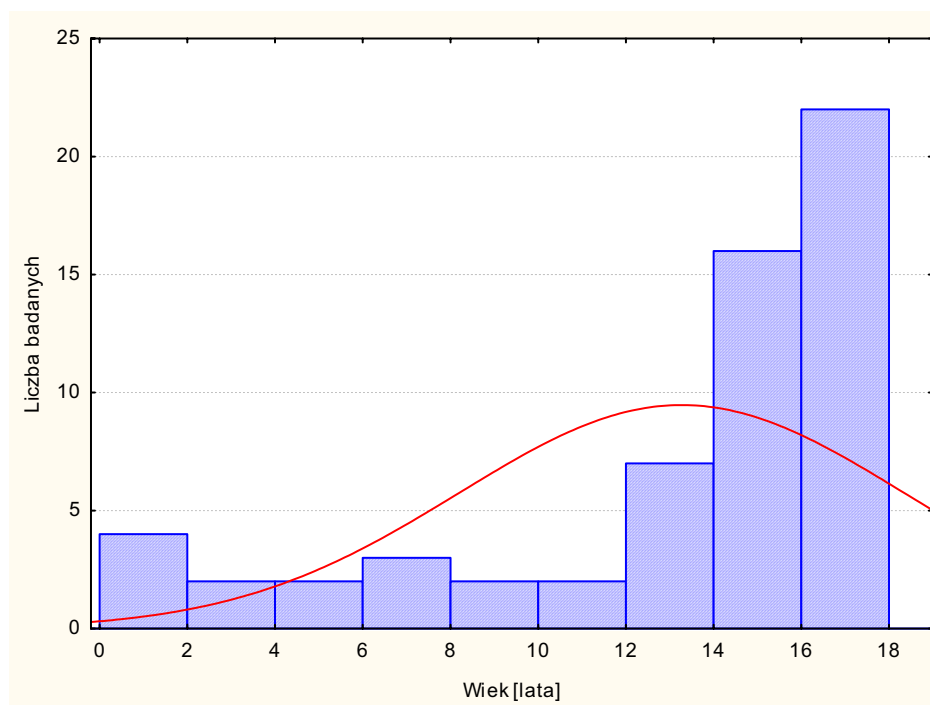
Pole powierzchni pod krzywą ROC (AUC, *Area Under Curve*) mieści się w przedziale wartości od 0 do 1. Im wynik bliższy jedności, tym lepsza wartość diagnostyczna testu, czyli zdolność do rozdzielenia wyników prawidłowych od nieprawidłowych. W badaniach własnych AUC dla oznaczania laktoferyny w kale wynosi 0,89, co wskazuje na dużą wartość diagnostyczną analizowanego testu w rozgraniczaniu stanu zdrowia od choroby (NZJ).



Rycina 5
 Krzywa ROC dla stężenia laktoferyny w kale dla całej
 badanej populacji (AUC 0,89)

4. 5. Grupa dzieci chorych

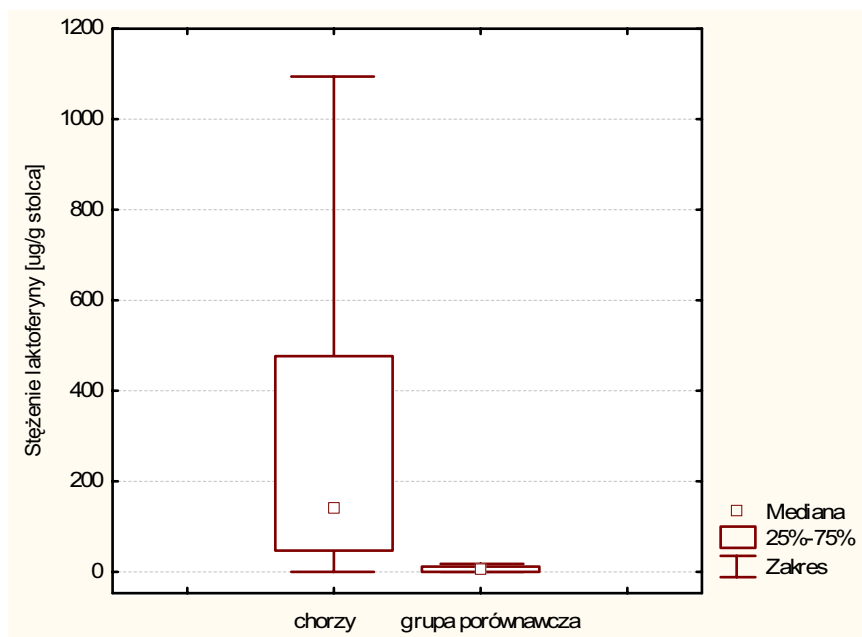
Grupa chorych liczyła 60 dzieci, w tym 25 (41,7%) dziewcząt i 35 (58,3%) chłopców w wieku od 0,3 do 18,0 lat (średnia $13,4 \pm 4,8$ lat, mediana 15,3 lat) (rycina 6). Rozkład wieku w grupie dzieci chorych różnił się statystycznie znamienne od rozkładu normalnego ($p < 0,001$). Wiek większej części badanych mieścił się w granicach od 14 do 18 lat.



Rycina 6
Rozkład wieku w grupie dzieci chorych

Materiał biologiczny poddany badaniom, pochodzący od chorych dzieci liczył 123 próbki kału. W 46 przypadkach (37,4%) pobrany był od dziewcząt, a w 77 od chłopców (62,6%).

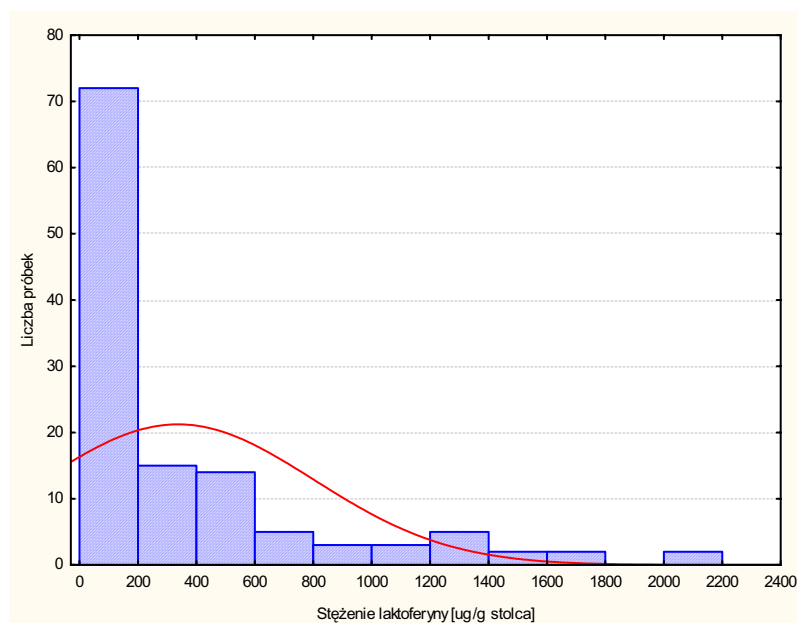
Stężenie laktoferyny w kale w grupie dzieci chorych mieściło się w szerokim zakresie od 0,01 do 2080,00 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $335,25 \pm 462,15 \mu\text{g/g}$ stolca, mediana 120,76 $\mu\text{g/g}$ stolca) i było statystycznie znacznie wyższe od wyników uzyskanych w grupie porównawczej ($p < 0,001$). Rycina 7 ilustruje porównanie obu tych wartości.



Rycina 7

Wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci chorych i u dzieci z grupy porównawczej ($p < 0,001$)

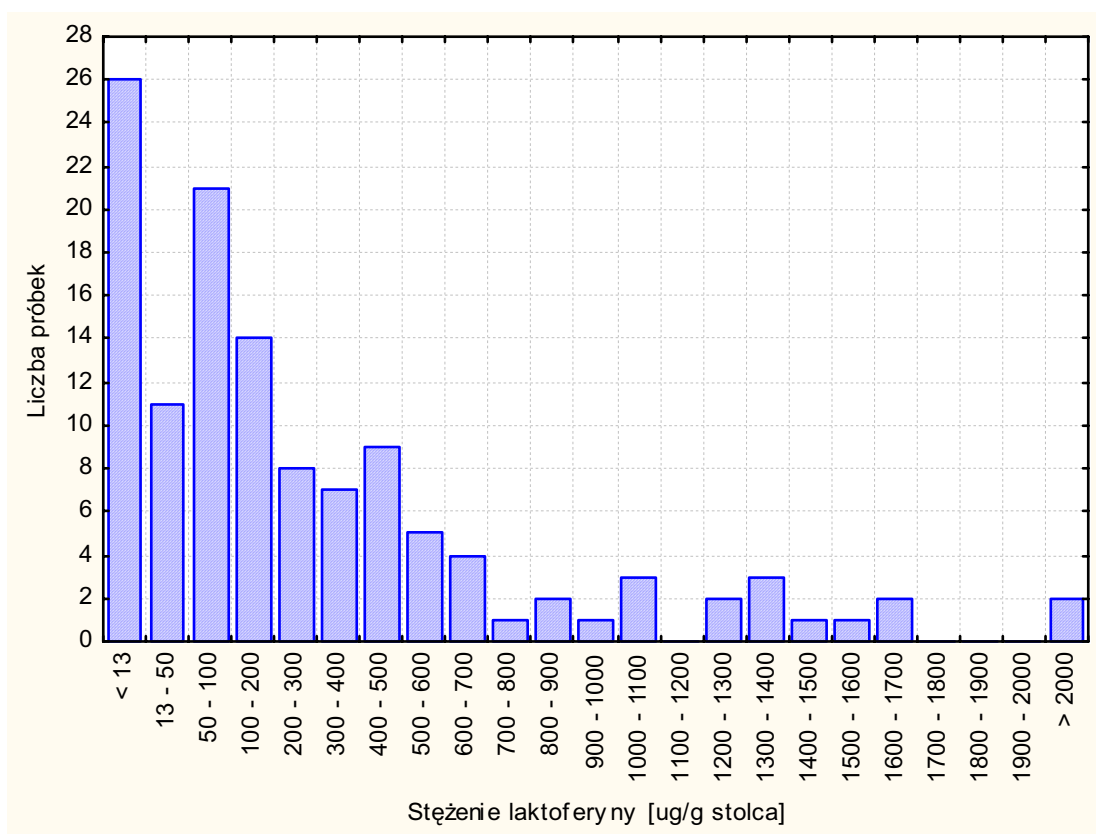
Na rycinie 8 przedstawiono rozkład stężenia laktoferyny w kale u dzieci chorych, różnił się on statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p < 0,001$).



Rycina 8

Rozkład stężenia laktoferyny w kale w grupie dzieci chorych

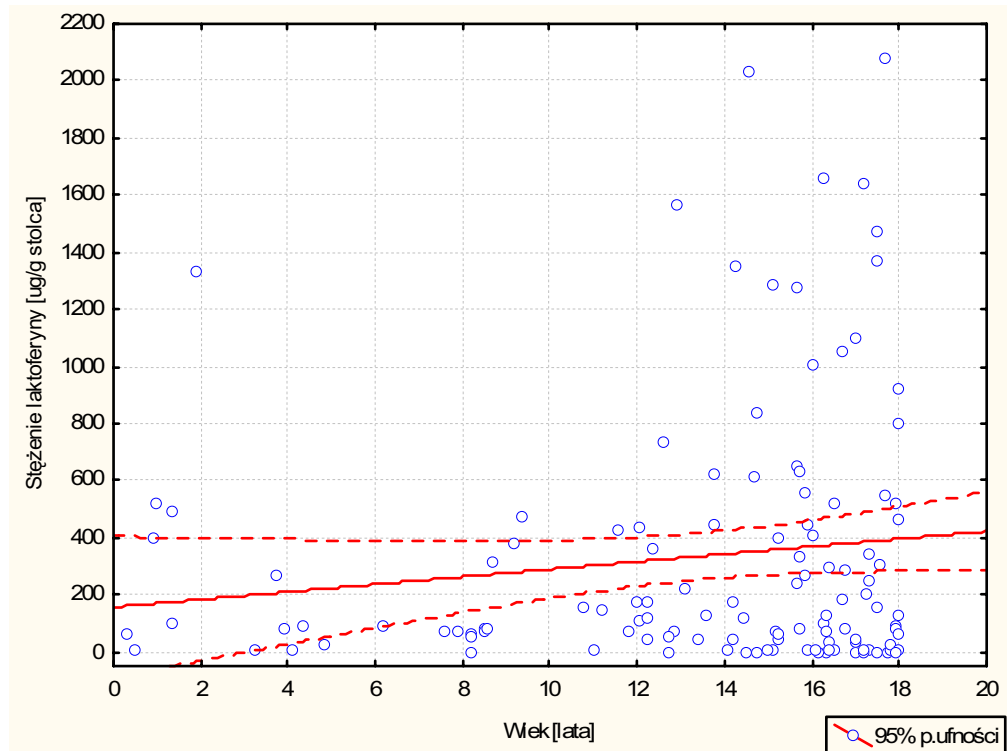
Następnie w grupie dzieci chorych przeanalizowano liczbę próbek w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale. Powyższa analiza została przedstawiona w postaci graficznej na rycinie 9. Wykazano, że tylko w 26 próbkach (21,1%) wynik był prawidłowy. W pozostałych 97 próbkach kału (78,9%) poziom laktoferyny był podwyższony. Przy czym większość oznaczeń mieściła się w wartościach poniżej 700 $\mu\text{g/g}$ stolca (79 próbek), pojedyncze zaś poniżej 1700 $\mu\text{g/g}$ stolca (16 próbek) i tylko 2 powyżej 2000 $\mu\text{g/g}$ stolca.



Rycina 9

Porównanie liczby otrzymanych wyników w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale u wszystkich dzieci chorych

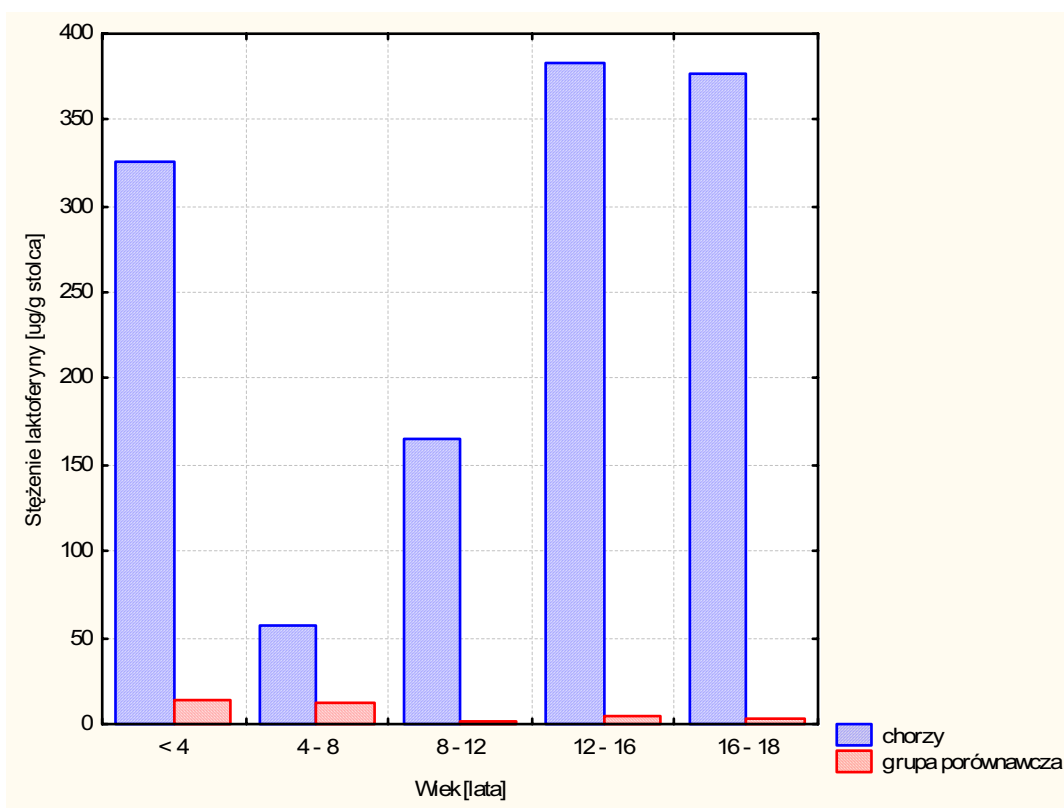
Kolejną analizą była próba ustalenia zależności między stężeniem laktoferyny w kale a wiekiem chorych dzieci. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji powyższych parametrów, co przedstawiono na rycinie 10 ($r=0,14$).



Rycina 10

Zależność stężenia laktoferyny w kale od wieku w grupie dzieci chorych $r=0,14$

Na rycinie 11 przedstawiono porównanie stężenia laktoferyny w kale u dzieci chorych i z grupy porównawczej w poszczególnych przedziałach wiekowych. Najwyższe indywidualne wartości stężenia laktoferyny w kale w grupie dzieci chorych obserwowano w grupie dzieci chorych w wieku do 4 lat oraz od 12 do 18 lat. Natomiast w grupie porównawczej wyższe wartości stężenia laktoferyny stwierdzono u dzieci w wieku do 8 lat.



Rycina 11

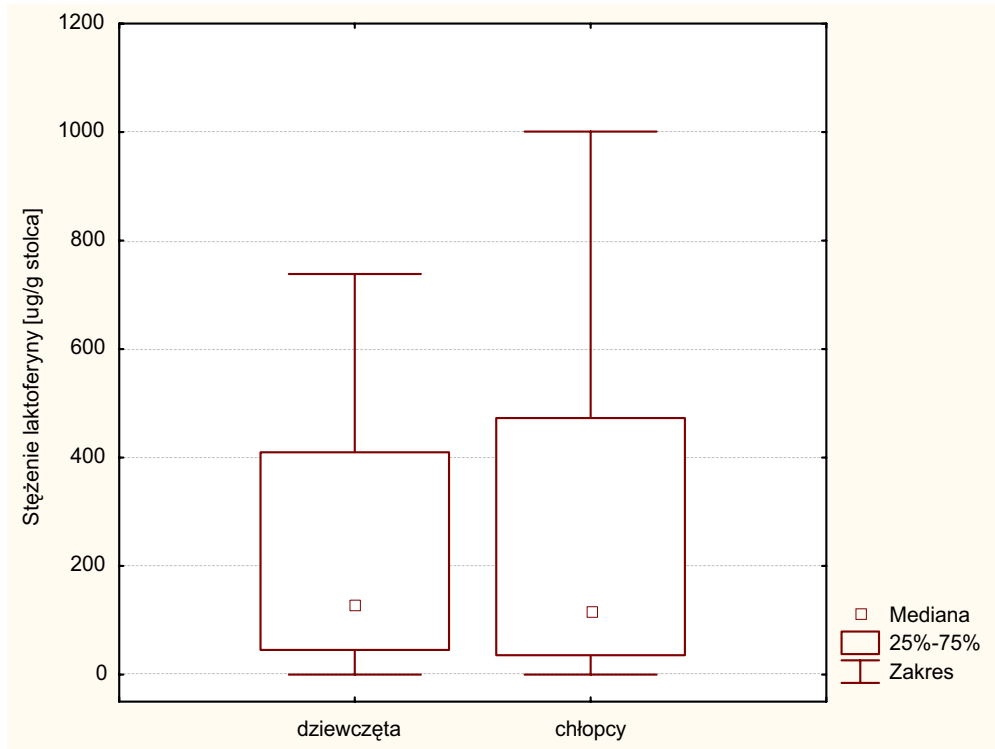
Wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci chorych i u dzieci z grupy porównawczej w poszczególnych grupach wiekowych

4. 5. 1. Stężenie laktoferyny w kale w zależności od płci dzieci chorych

W grupie dzieci chorych w 46 (37,4%) przypadkach materiał pochodził od dziewcząt, a w 77 (62,6%) od chłopców. W grupie dziewcząt wiek wahał się od 1,3 do 18,0 lat (średnia $13,9 \pm 4,0$ lat, mediana 14,7 lat), zaś u chłopców od 0,3 do 18,0 lat (średnia $13,2 \pm 5,2$ lat, mediana 15,3 lat) i nie różnił się znamiennej od wieku dziewcząt ($p=0,638$).

Stężenie laktoferyny w kale w materiale pobranym od dziewcząt mieściło się w zakresie od 0,10 do 2080,00 µg/g stolca (średnia $298,34 \pm 431,23$ µg/g stolca, mediana 128,95 µg/g stolca), natomiast u chłopców wahało się od 0,01 do 2032,80 µg/g stolca (średnia $357,30 \pm 481,08$ µg/g stolca, mediana 116,80 µg/g stolca). Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy między stężeniami laktoferyny w kale u chorych

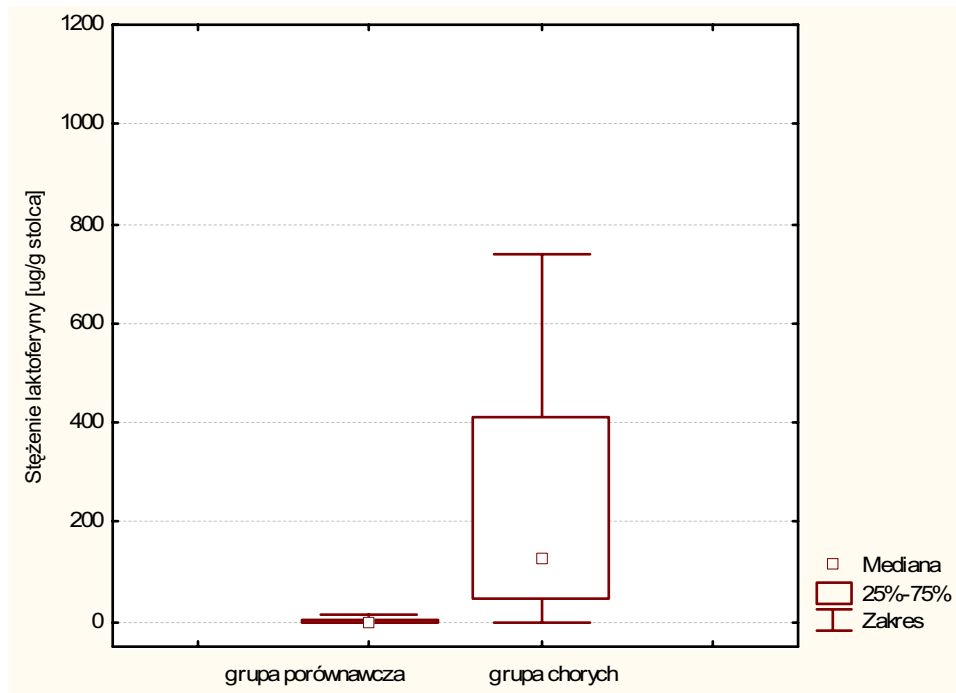
dziewcząt i chłopców ($p=0,496$). Graficzne porównanie obu wartości ilustruje rycina 12.



Rycina 12

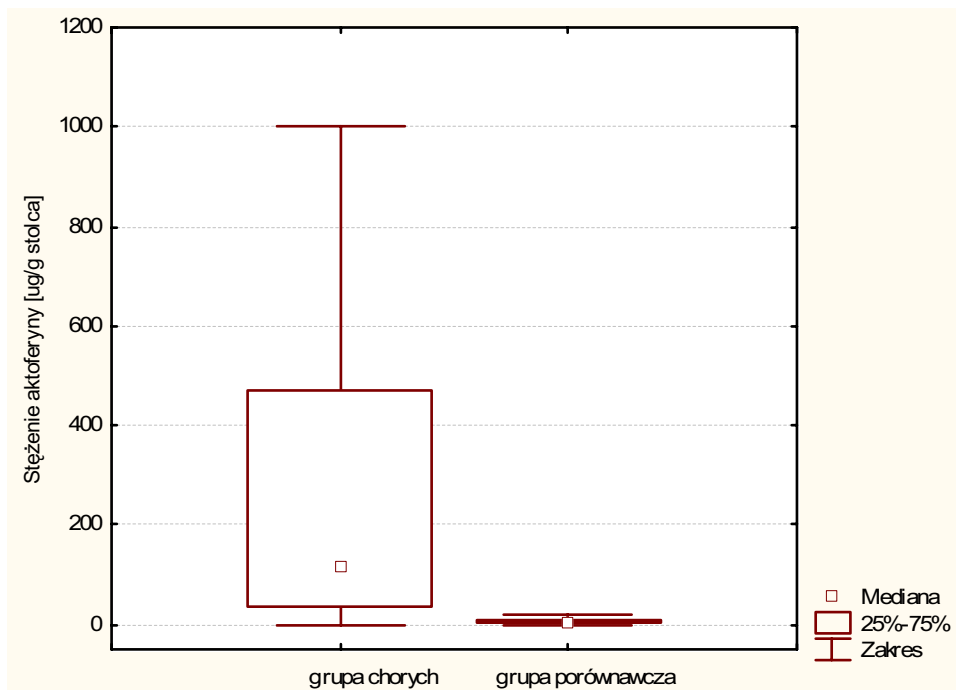
Wartości stężenia laktoferyny w kale u chłopców i u dziewcząt w grupie dzieci chorych ($p=0,496$)

Następnie oddzielnie porównano wartości stężeń laktoferyny u dzieci z grupy porównawczej i dzieci chorych, po podziale obu grup zgodnie z płcią badanego. Wykazano, że wartości uzyskane u dziewcząt chorych były wyższe niż u dziewcząt z grupy porównawczej i była to różnica statystycznie znamienne ($p=0,0017$; rycina 13). Podobnie, wartości uzyskane u chłopców chorych były wyższe niż u chłopców z grupy porównawczej. Także w tym przypadku różnica była statystycznie istotna ($p=0,0012$; rycina 14).



Rycina 13

Porównanie wartości stężenia laktoferyny w kale u dziewcząt w grupie porównawczej i w grupie chorych ($p=0,0017$)



Rycina 14

Porównanie wartości stężenia laktoferyny w kale u chłopców w grupie chorych i w grupie porównawczej ($p=0,0012$)

4. 5. 2 Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od rozpoznania

W kolejnym etapie pracy grupę dzieci chorych podzielono w zależności od rozpoznania na 4 podgrupy:

WZJG – pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W tej grupie uzyskano 59 próbek kału.

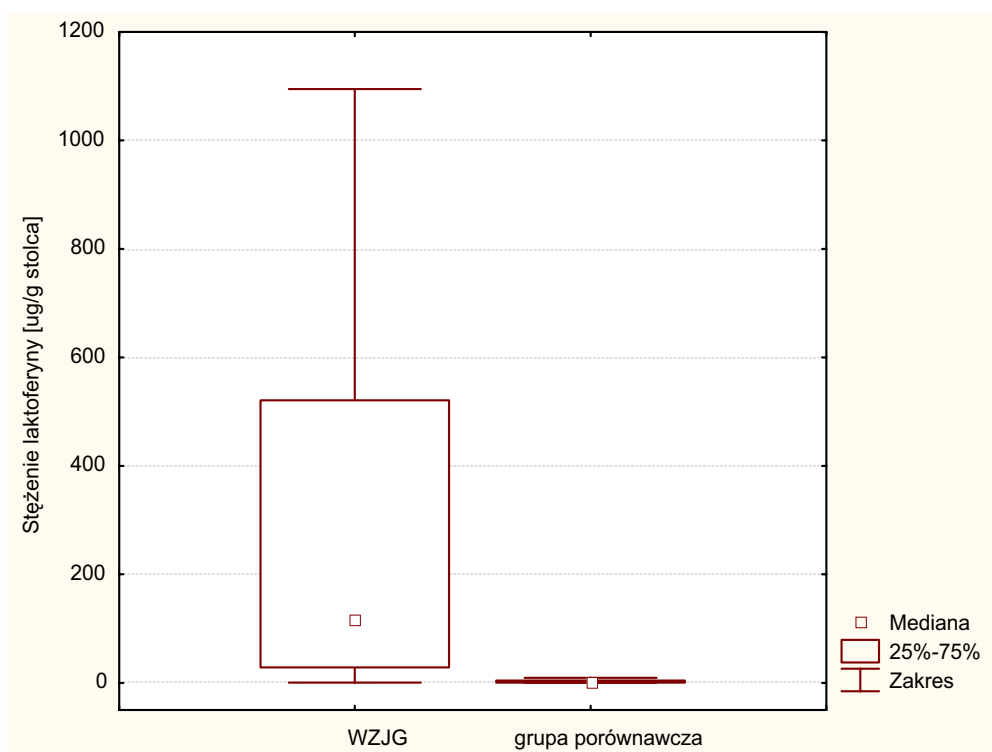
CHL-C – pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna. W tej grupie uzyskano 55 próbek kału.

NZJG – dzieci z niespecyficznym zapaleniem jelita grubego (*colitis non specifica*). W tej grupie uzyskano 4 próbki kału.

ZP – pacjenci z zapaleniem błony śluzowej proctnicy (*proctitis*). W tej grupie uzyskano 5 próbek kału.

Wiek pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) wahał się od 1,9 do 18,0 lat (średnia $14,2 \pm 4,2$ lat, mediana 16,4 lat).

Stężenie laktoferyny w kale u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) mieściło się w szerokim zakresie od 0,55 do 2080,00 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $409,35 \pm 574,49$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 116,80 $\mu\text{g/g}$ stolca) i było statystycznie znamienne wyższe od wartości w grupie porównawczej, których średnia wynosiła $3,65 \pm 4,71$ $\mu\text{g/g}$ stolca, a mediana 1,43 $\mu\text{g/g}$ stolca ($p < 0,001$) (rycina 15).

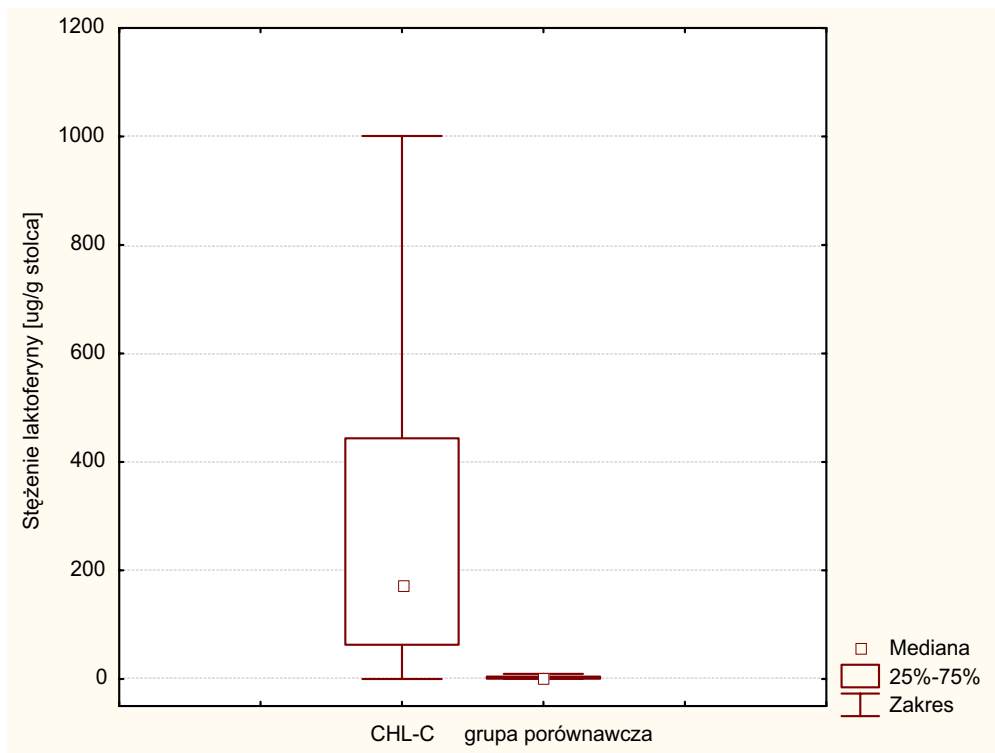


Rycina 15

Porównanie wartości stężenia laktoferyny u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i u dzieci z grupy porównawczej ($p < 0,001$)

Wiek pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) wahał się od 0,9 do 18,0 lat (średnia $13,2 \pm 5,1$ lat, mediana 14,2 lat).

Stężenie laktoferyny w kale u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) mieściło się w zakresie od 0,01 do 1368,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $298,15 \pm 326,46$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 172,88 $\mu\text{g/g}$ stolca) i było statystycznie znamienne wyższe od stężeń w grupie porównawczej ($p < 0,001$). Graficzne porównanie tych wartości przedstawiono na rycinie 16.

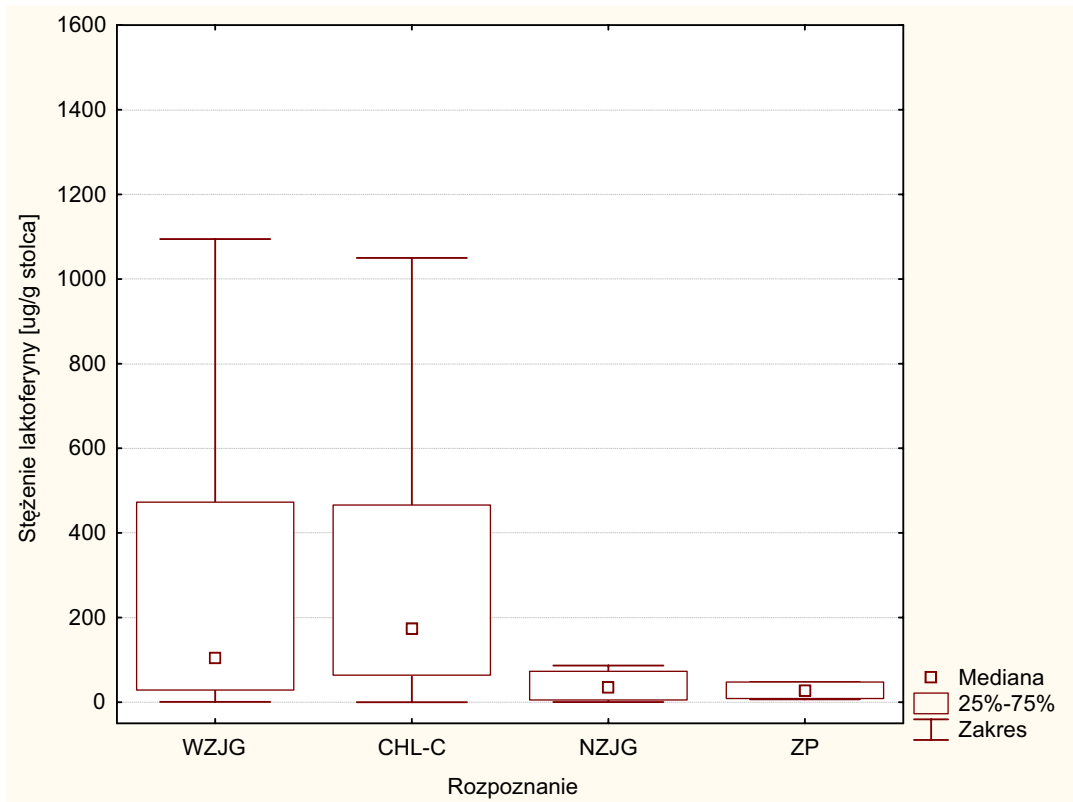


Rycina 16

Porównanie wartości stężenia laktoferyny u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) i u dzieci z grupy porównawczej ($p < 0,001$)

U dzieci z niespecyficznym zapaleniem jelita grubego (NZJG) stężenie laktoferyny w kale wahało się od 0,40 do 86,76 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $38,99 \pm 40,87 \mu\text{g/g}$ stolca, mediana 34,40 $\mu\text{g/g}$ stolca), natomiast u dzieci z zapaleniem błony śluzowej proctnicy (ZP) wartości mieściły się w zakresie od 6,72 do 441,05 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $106,02 \pm 188,01 \mu\text{g/g}$ stolca, mediana 26,48 $\mu\text{g/g}$ stolca). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między stężeniami laktoferyny uzyskanymi w obu tych grupach ($p > 0,05$) (rycina 17).

Wartości stężenia laktoferyny w kale u wszystkich chorych dzieci, w zależności od rozpoznania, ilustruje rycina 17.



Rycina 17

Porównanie wartości stężenia laktoferyny w kale w zależności od rozpoznania:
WZJG – wrzodziejące zapalenie jelita grubego, CHL-C – choroba Leśniowskiego-Crohna, NZJG – niespecyficzne zapalenie jelita grubego, ZP – zapalenie prostaty

Porównanie między wartościami stężenia laktoferyny w kale u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna nie wykazało statystycznie znamiennej różnicy ($p=0,211$) (rycina 17).

4. 5. 3. Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od stopnia aktywności klinicznej choroby

Kolejnym etapem niniejszej pracy była próba ustalenia zależności między stężeniem laktoferyny w kale a stopniem aktywności klinicznej choroby. Analizie poddano wyniki uzyskane u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz oddzielnie u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zastosowano trzystopniowy wskaźnik Truelove-Wittsa (załącznik 2). Punktacja od 0 do 4 oznaczała łagodną postać choroby, a od 5 do 8 umiarkowaną postać choroby. Ciężka postać dotyczyła punktacji od 9 do 12. Poziomy laktoferyny w kale w poszczególnych podgrupach przedstawiały się następująco.

W podgrupie z łagodną postacią choroby (42 próbki) wartości mieściły się w zakresie od 0,55 do 2080 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $330,87 \pm 536,52$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 79,5 $\mu\text{g/g}$ stolca). W podgrupie z umiarkowaną postacią choroby (15 próbek) stężenie wahało się od 1,1 do 1658,4 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $642,4 \pm 661,94$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 312,6 $\mu\text{g/g}$ stolca). Do podgrupy z ciężką postacią choroby zakwalifikowano 2 dzieci, a oznaczone wartości wynosiły 71,74 i 547,2 $\mu\text{g/g}$ stolca.

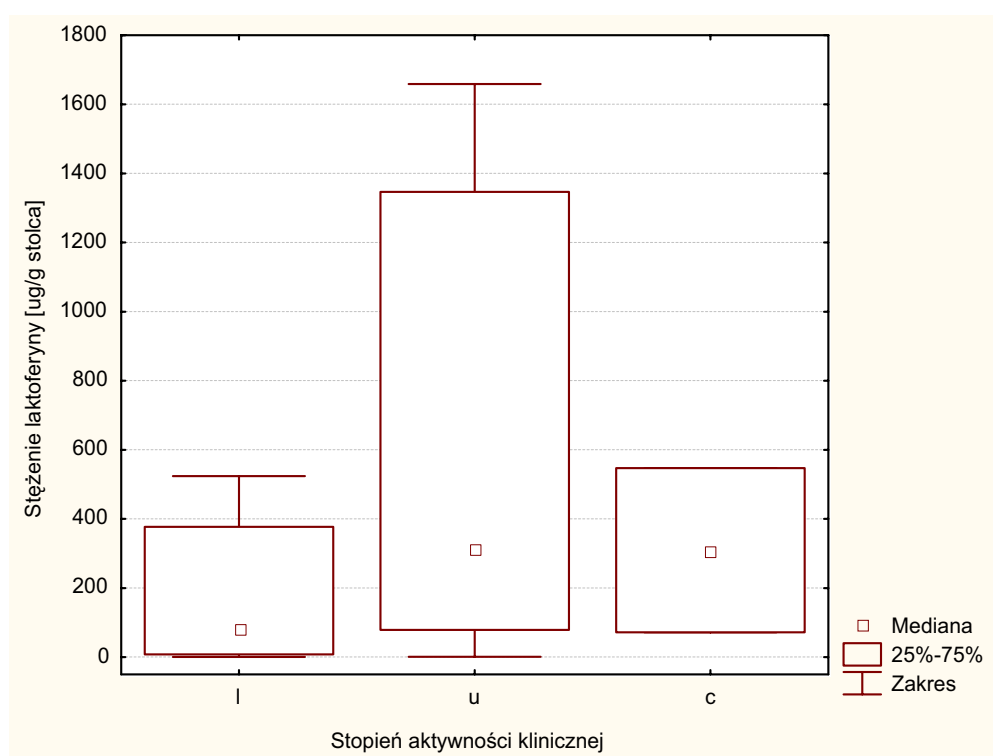
Całość wyników po klasyfikacji zgodnej ze wskaźnikiem Truelove-Wittsa przedstawiono w tabeli 14 i na rycinie 18.

Wykazano statystycznie znamiennej różnicę wartości stężenia laktoferyny w kale między podgrupami z łagodną i umiarkowaną postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego ($p < 0,05$). Ze względu na małą liczbę dzieci z ciężką postacią choroby, podgrupy tej nie porównywano z pozostałymi.

Tabela 4

Wartości stężenia laktoferyny w kale u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) w poszczególnych stopniach aktywności klinicznej choroby według indeksu Truelove-Wittsa w modyfikacji Ryzki

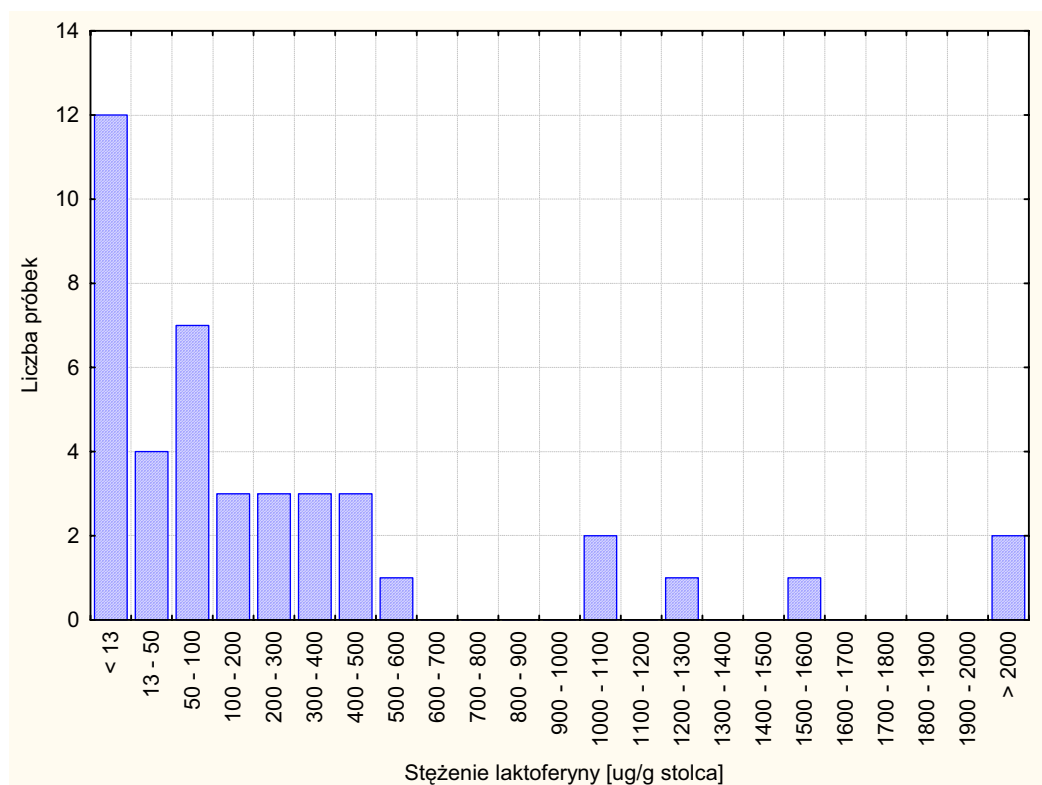
Stopień aktywności klinicznej choroby	Liczba próbek	Stężenie laktoferyny w kale ($\mu\text{g/g}$ stolca)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
łagodny	42	330,87	79,5	0,55	2080	536,52
umiarkowany	15	642,4	312,6	1,1	1658,4	661,94
ciężki	2			71,74	547,2	



Rycina 18

Porównanie wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita (WZJG) w zależności od stopnia aktywności klinicznej według indeksu Truelove – Wittsa: l – łagodna postać, u – umiarkowana postać, c – ciężka postać

Następnie w podgrupie dzieci z łagodną postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego analizie poddano liczbę próbek, mieszczącą się w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale (rycina 19). Wykazano, że jedynie w 12 przypadkach (28,6%) wartości były prawidłowe. W pozostałych 30 próbkach kału (71,4%) poziomy laktoferyny były podwyższone. Wśród nich większość mieściła się w przedziale od 13 do 500 $\mu\text{g/g}$ stolca (23 próbki), pojedyncze oznaczenia mieściły się w zakresach: od 500 do 600 $\mu\text{g/g}$ stolca – 1 próbka, od 1000 do 1100 $\mu\text{g/g}$ stolca - 2 próbki, od 1200 do 1300 $\mu\text{g/g}$ stolca – 1 próbka, od 1500 do 1600 $\mu\text{g/g}$ stolca – 1 próbka, powyżej 2000 $\mu\text{g/g}$ stolca – 2 próbki.



Rycina 19

Porównanie liczby otrzymanych wyników w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale u chorych z łagodną postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

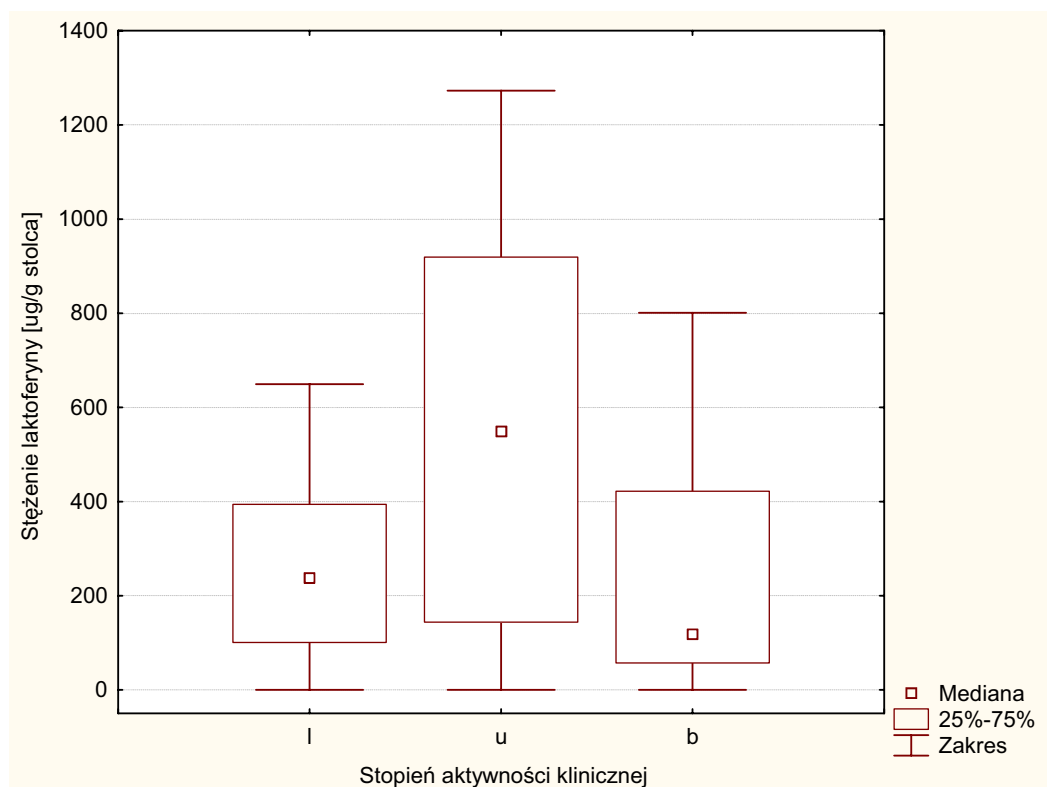
U dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C), w ocenie aktywności klinicznej choroby, zastosowano Pediatriczny Wskaźnik Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna w modyfikacji Ryżki (PCDAI) (załącznik 1). Punktacja od 0 do 10 oznaczała brak aktywności klinicznej choroby, od 11 do 25 łagodną postać choroby. Pacjenci z umiarkowaną postacią uzyskali od 26 do 50 punktów. Natomiast w analizowanym materiale nie było ani jednego pacjenta z wynikiem powyżej 51 punktów co oznacza, że nie było ani jednego dziecka z ciężką postacią choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C).

Wyniki uzyskane w powyższych podgrupach były następujące. U pacjentów z nieaktywną postacią choroby (36 próbek) stężenie laktoferyny w kale mieściło się w zakresie od 0,008 do 1358,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $268,97 \pm 320,88$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 118,20). W podgrupie z łagodną postacią choroby (13 próbek) wartości mieściły się w zakresie od 0,31 do 649,40 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $252,43 \pm 206,63$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 238,50). Natomiast w podgrupie z umiarkowaną postacią choroby (6 próbek) stężenie laktoferyny w kale wahało się od 0,10 do 1272,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $572,27 \pm 475,51$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 548,90). Całość wyników po klasyfikacji według PCDAI przedstawiono w tabeli 5 i na rycinie 20.

Tabela 5

Wartości stężenia laktoferyny w kale u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) w poszczególnych stopniach aktywności klinicznej choroby według Pediatricznego Wskaźnika Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna w modyfikacji Ryżki (PCDAI)

Stopień aktywności klinicznej choroby	Liczba próbek	Stężenie laktoferyny w kale ($\mu\text{g/g}$ stolca)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Brak aktywności	36	268,97	118,2	0,008	1358,80	320,88
Łagodny	13	252,43	238,5	0,31	649,4	206,63
Umiarkowany	6	572,27	548,9	0,1	1272,8	475,51
Ciężki	0					



Rycina 20

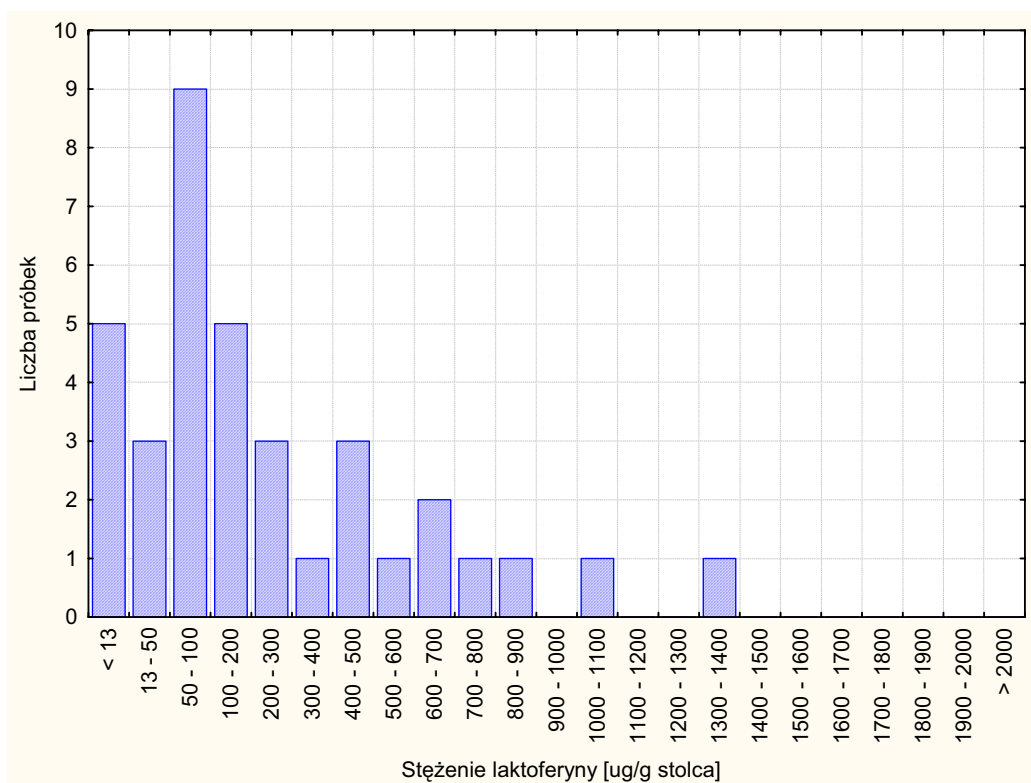
Porównanie wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) w zależności od stopnia aktywności klinicznej według indeksu PCDAI (b – brak aktywności, I – łagodna postać, u – umiarkowana postać)

Przeprowadzona analiza wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci z różnym stopniem aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) według PCDAI wykazała statystycznie znaczącą różnicę między pacjentami z łagodną i umiarkowaną postacią kliniczną choroby ($p < 0,05$). Natomiast poziomy w grupach z nieaktywną i łagodną postacią choroby nie różniły się ($p > 0,05$) (rycina 20).

Oddzielnej analizie poddano liczbę próbek pobraną od pacjentów z nieaktywną postacią i łagodną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale.

W podgrupie z nieaktywną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) jedynie w 5 przypadkach (13,9%) stężenie laktoferyny w kale było prawidłowe. W

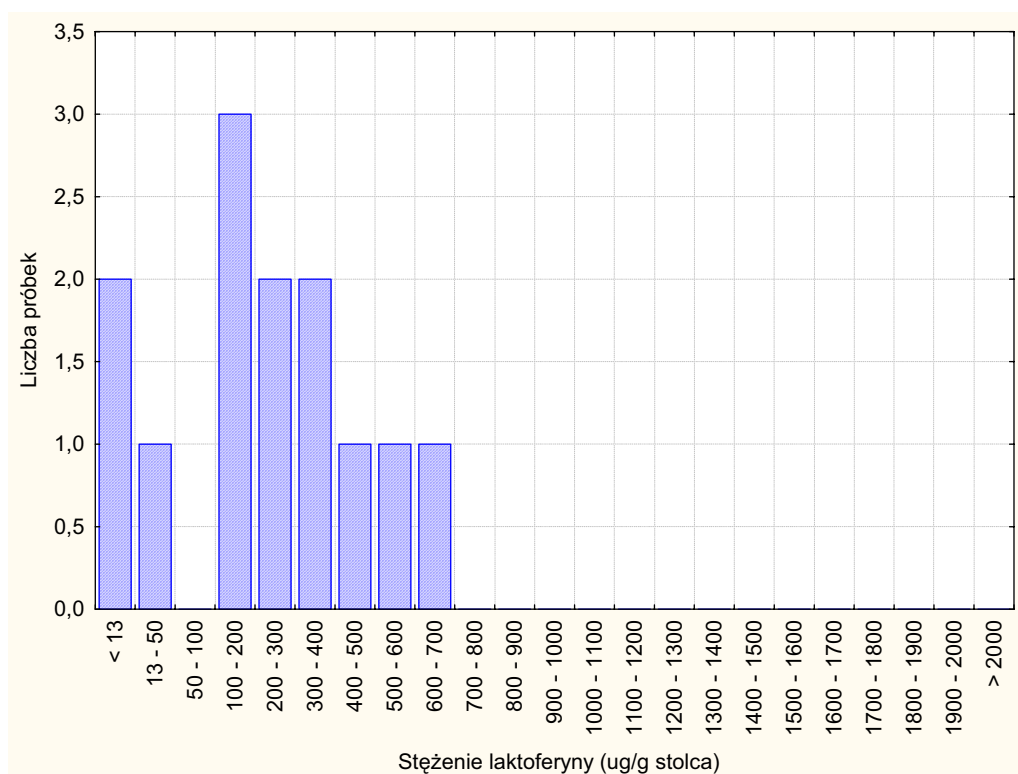
pozostałych 31 próbkach (86,1%) poziomy laktoferyny były podwyższone, wśród nich większość mieściła się w zakresie poniżej 500 $\mu\text{g/g}$ stolca (24 próbki), a pojedyncze od 500 do 1400 $\mu\text{g/g}$ stolca (7 próbek). Powyższa analiza została przedstawiona na rycinie 21.



Rycina 21

Porównanie liczby otrzymanych wyników w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci z nieaktywną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C)

Natomiast w podgrupie z łagodną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna (CHL-C) wartości prawidłowe stwierdzono tylko w 2 przypadkach (15,4%). W pozostałych 11 próbkach (84,6%) poziomy laktoferyny były podwyższone, ale mieściły się w zakresie niższym niż 700 $\mu\text{g/g}$ stolca, co zostało przedstawione graficznie na rycinie 22.



Rycina 22

Porównanie liczby otrzymanych wyników w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci z łagodną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna

4. 5. 4. Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od stopnia nasilenia zmian endoskopowych

W badanej grupie wszystkich dzieci chorych poszukiwano ewentualnej zależności między poziomem laktoferyny w kale a nasileniem zmian endoskopowych. Badanie kolonoskopowe wykonano u 47 pacjentów (u 12 zostało wykonane dwukrotnie, a u 3 trzykrotnie); wykonywano je jedynie u tych dzieci, u których istniały ścisłe wskazania do przeprowadzenia tego typu diagnostyki. W ocenie zmian makroskopowych zastosowano skalę zaproponowaną przez *Langhorsta i wsp.* (tabela 6), zgodnie z którą grupę dzieci chorych podzielono na 4 podgrupy (89).

Tabela 6

Zaawansowanie zmian makroskopowych w endoskopii

Liczba punktów	Charakter zmian	Zmiany makroskopowe
0	Prawidłowy obraz	Bez zmian
1	Łagodne zmiany	Rumień, zmniejszenie lub zniesienie rysunku naczyniowego, kruchość błony śluzowej, obecność pojedynczych aft
2	Umiarkowane zmiany	Obecność licznych aft i niewielkich owrzodzeń
3	Masywne zmiany	Obecność dużych owrzodzeń, spontaniczne krwawienie, grudki, zwężenie światła jelita

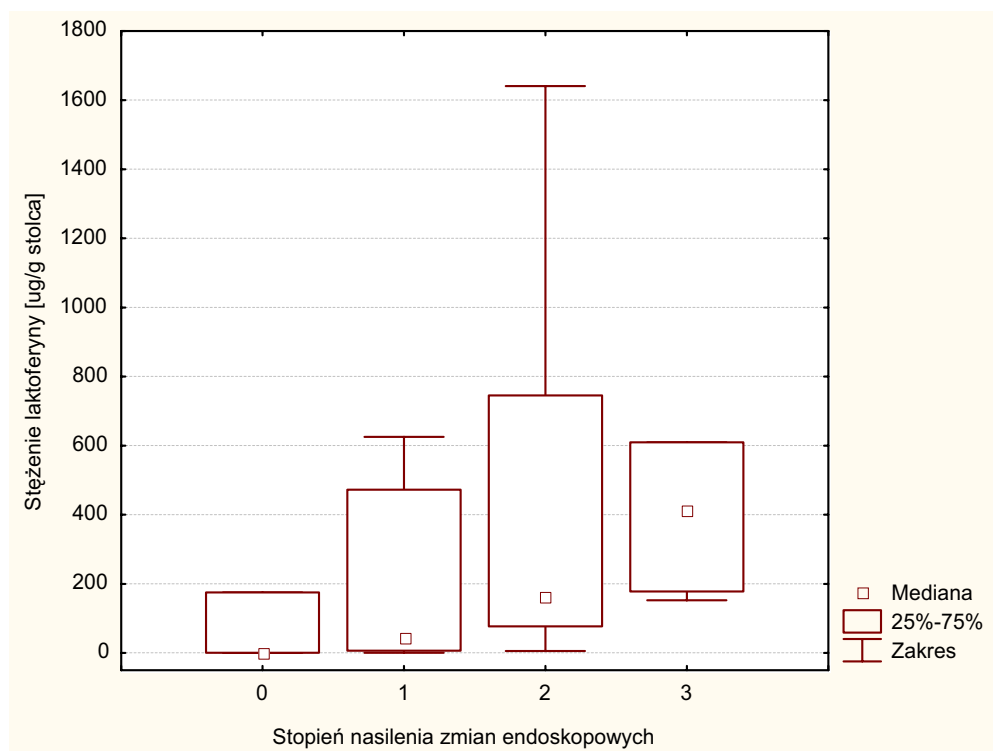
Wartości stężenia laktoferyny w kale u dzieci chorych z poszczególnym stopniem nasilenia zmian endoskopowych przedstawiały się następująco. U dzieci z prawidłowym obrazem błony śluzowej w badaniu kolonoskopowym (N=7), stężenie laktoferyny w kale wahało się od 0,1 do 919,2 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia 160,66 \pm 340,52 $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 1,1 $\mu\text{g/g}$ stolca). W tej podgrupie w 2 przypadkach stężenie laktoferyny w kale było podwyższone, mimo iż nie stwierdzono u nich zmian zapalnych w badaniu kolonoskopowym. U dzieci z łagodnym stanem zapalnym jelita (N=18) poziom laktoferyny w kale wahał się od 0,4 do 1658,4 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia 371,40 \pm 551,98 $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 46,47 $\mu\text{g/g}$ stolca). U pacjentów z umiarkowanymi zmianami endoskopowymi (N=33) stężenie mieściło się w zakresie od 5,37 do 2080,00 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia 500,48 \pm 603,38 $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 163,04 $\mu\text{g/g}$ stolca), natomiast u pacjentów z zaawansowanymi zmianami zapalnymi stwierdzonymi w endoskopii (N=7) stężenie laktoferyny mieściło się w zakresie od 152,28 do 1288,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia 480,70 \pm 394,34 $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 409,92 $\mu\text{g/g}$ stolca). Całość powyższych wyników zawiera tabela 7, a graficznie zostały przedstawione na rycinie 23.

Tabela 7

Wartości stężenia laktoferyny w kale w poszczególnych stopniach nasilenia zmian endoskopowych

Stopień nasilenia zmian endoskopowych	Liczba badań	Stężenie laktoferyny w kale ($\mu\text{g/g}$ stolca)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
0	7	160,66	1,1	0,1	919,2	340,52
1	18	371,40	46,47	0,4	1658,4	551,98
2	33	500,48	163,04	5,37	2080,00	603,38
3	7	480,70	409,92	152,28	1288,80	394,34

Statystycznie wyższe wartości stężenia laktoferyny w kale wykazano u pacjentów z większym stopniem nasilenia zmian zapalnych błony śluzowej jelita, stwierdzanym w badaniu kolonoskopowym. Powyższa tendencja dotyczyła porównania między wszystkimi analizowanymi grupami ($p = 0,043$) (rycina 23).



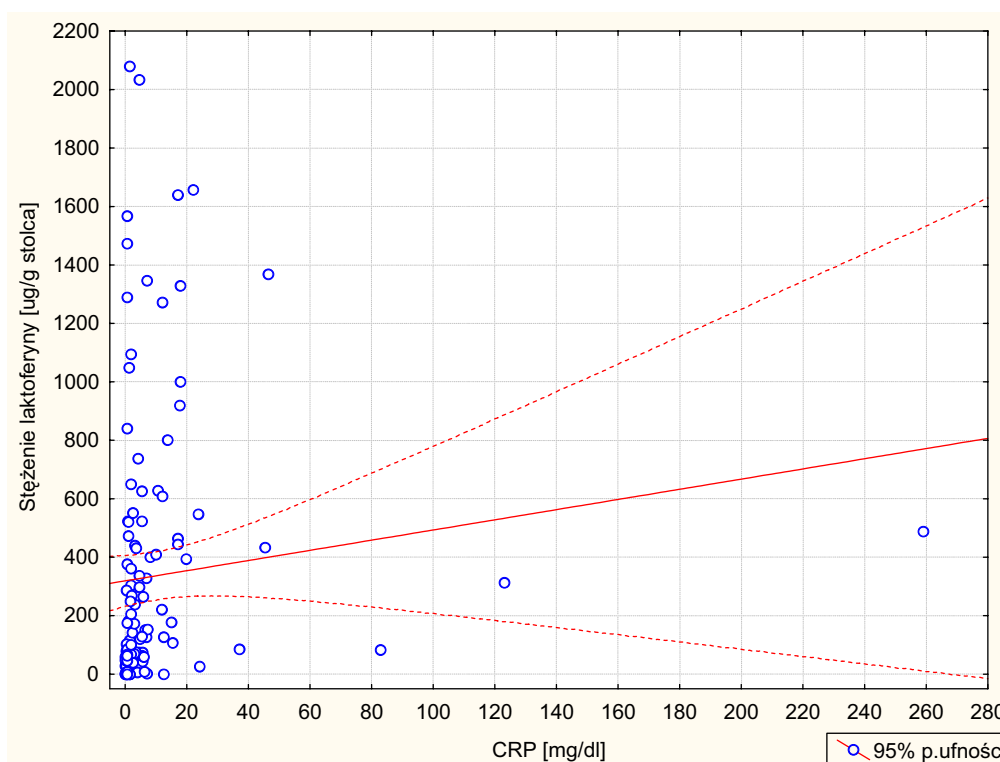
Rycina 23

Wartości stężenia laktoferyny w kale w zależności od stopnia nasilenia zmian endoskopowych (0-prawidłowy obraz błony śluzowej jelita; 1-łagodne zmiany zapalne, 2-umiarkowane zmiany zapalne, 3-masywne zmiany zapalne)

4. 5. 5. Stężenie laktoferyny w kale a inne parametry stanu zapalnego u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit

Następnie przeprowadzono porównanie stężenia laktoferyny w kale z klasycznymi parametrami stanu zapalnego: stężeniem białka C-reaktywnego w surowicy krwi (CRP), odczynem opadania krwinek czerwonych (OB), liczbą krwinek białych (LEU), liczbą granulocytów obojętnochłonnych (GRAN) i liczbą płytek krwi w badaniu morfotycznym krwi (PLT) oraz stężeniem fibrynogenu w osoczu krwi (FIBR).

Wartości stężenia białka C-reaktywnego (CRP) u dzieci chorych mieściły się w zakresie od 0,10 do 259,0 mg/dl (średnia $9,24 \pm 27,25$ mg/dl, mediana 1,90 mg/dl). Nie wykazano korelacji między stężeniem laktoferyny w kale a stężeniem białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi u dzieci chorych ($r=0,1$). Poniżej na ryc.24 przedstawiono próbę ustalenia tej zależności.

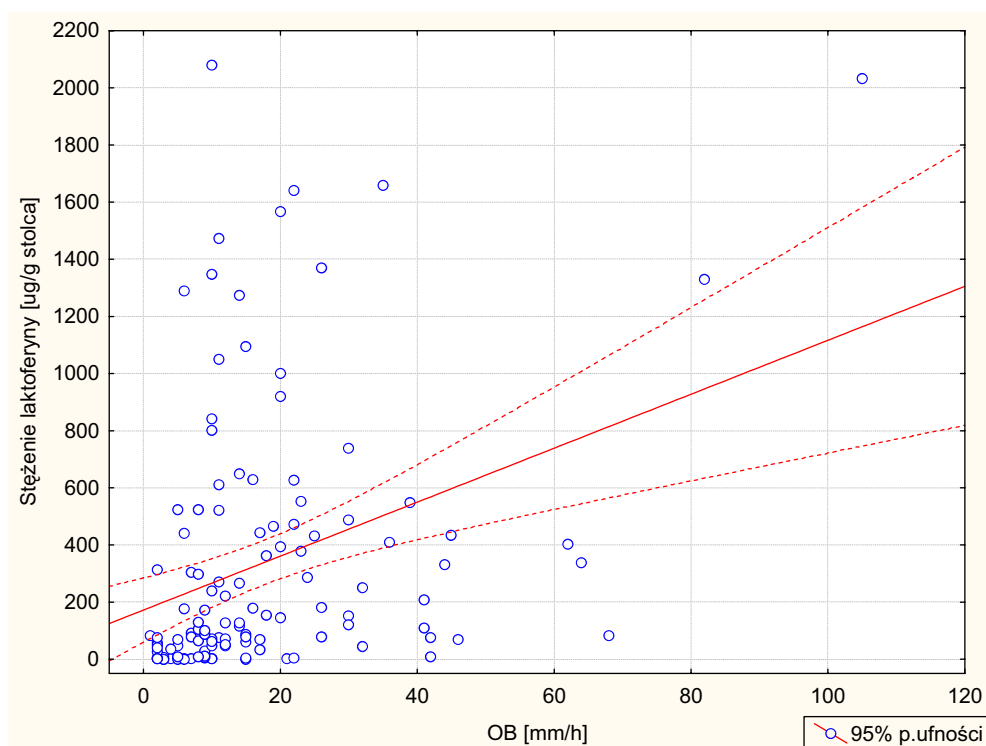


Rycina 24

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale ze stężeniem białka C-reaktywnego w surowicy krwi (CRP) ($r=0,1$)

Wartości odczynu opadania krwinek czerwonych (OB) u dzieci chorych mieściły się w zakresie od 1,0 do 105,0 mm/h (średnia $17,3 \pm 16,63$ mm/h, mediana 12,0 mm/h).

Nie wykazano korelacji między stężeniem laktoferyny w kale a wartością odczynu opadania krwinek czerwonych (OB) ($r=0,34$), co zilustrowano na rycinie 25.

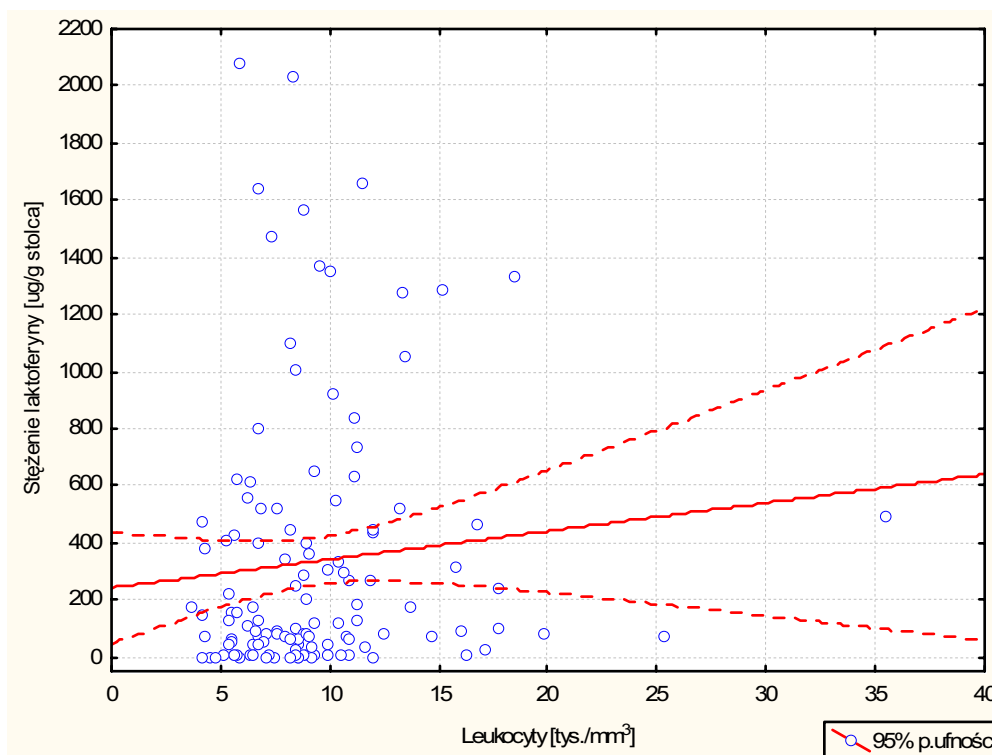


Rycina 25

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale z odczynem opadania krwinek czerwonych (OB) ($r=0,34$)

Liczba krwinek białych we krwi obwodowej (LEU) u dzieci chorych mieściła się w szerokim zakresie od 3,67 do 35,50 tysięcy/mm³ (średnia 9,36 ± 4,38 tysięcy/mm³, mediana 8,53 tysięcy/mm³).

Nie wykazano korelacji między stężeniem laktoferyny w kale a liczbą krwinek białych we krwi obwodowej (LEU) ($r=0,09$), co przedstawiono na rycinie 26.

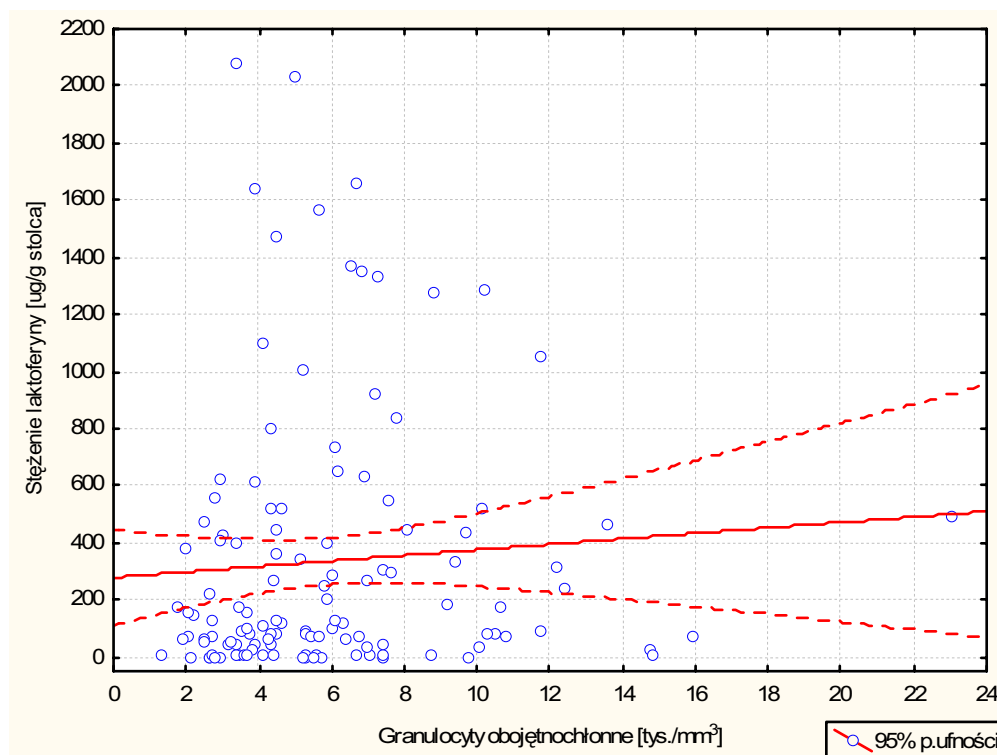


Rycina 26

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale z liczbą leukocytów we krwi obwodowej ($r=0,09$)

Bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej (GRAN) u dzieci chorych wahała się od 1,30 do 23,07 tysięcy/mm³ (średnia 5,90 ± 3,42 tysięcy/mm³, mediana 5,19 tysięcy/mm³).

Nie wykazano korelacji między stężeniem laktoferyny w kale a bezwzględną liczbą granulocytów we krwi obwodowej (GRAN) ($r=0,07$). Próbę ustalenia tej zależności zilustrowano na rycinie 27.

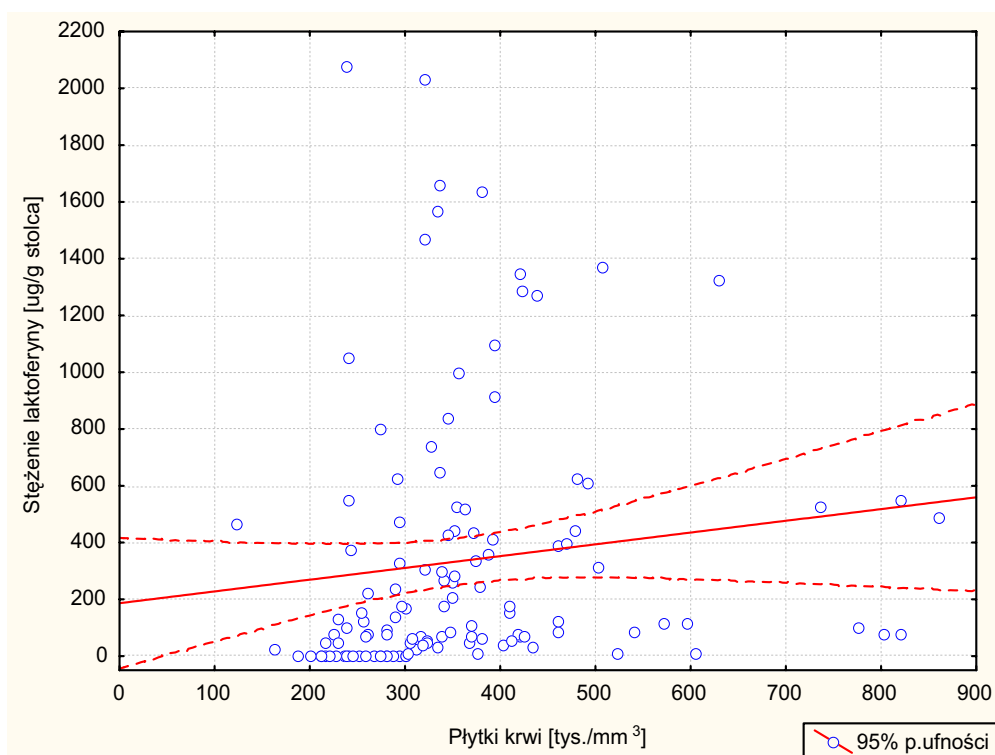


Rycina 27

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale z liczbą granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej (GRAN) ($r=0,07$)

Liczba płytek we krwi obwodowej (PLT) u dzieci chorych wahała się od 122,0 do 860,0 tysięcy/mm³ (średnia 358,90 ± 137,84 tysięcy/mm³, mediana 334,0 tysięcy/mm³).

Nie wykazano zależności między stężeniem laktoferyny w kale a liczbą płytek we krwi obwodowej (r=0,12), co przedstawiono rycinie 28.

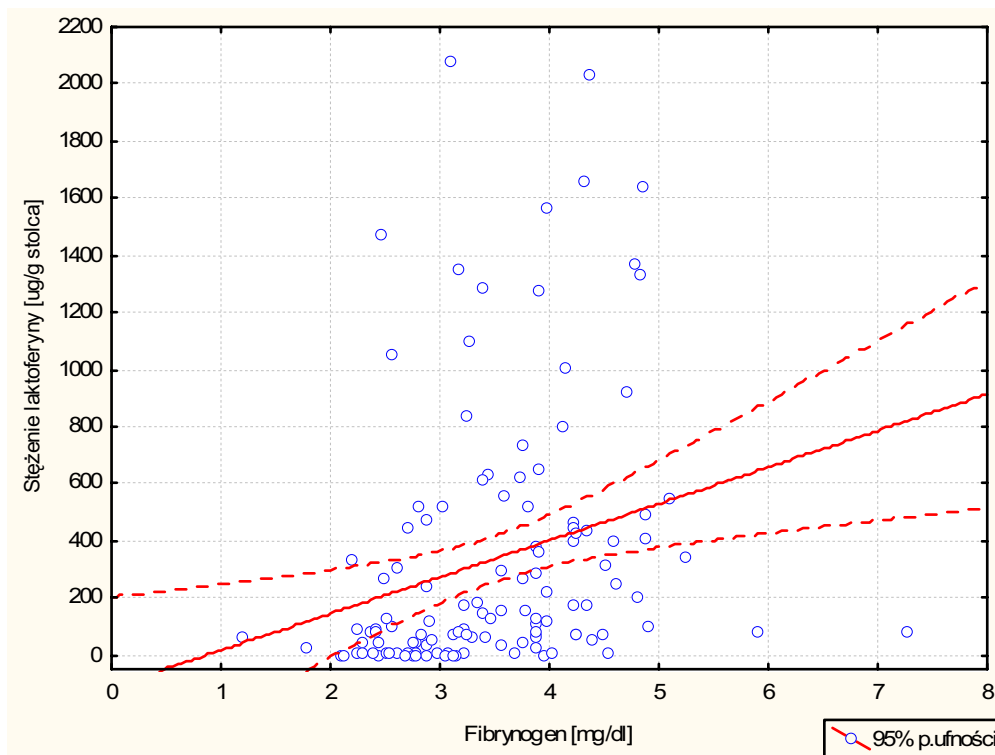


Rycina 28

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale z liczbą płytek krwi we krwi obwodowej (r=0,12)

Stężenie fibrynogenu w osoczu krwi u dzieci chorych wahało się w zakresie od 1,20 do 7,28 mg/dl (średnia $3,48 \pm 0,92$ mg/dl, mediana 3,39 mg/dl).

Nie stwierdzono korelacji między stężeniem laktoferyny w kale a stężeniem fibrynogenu w osoczu krwi ($r=0,25$). Próbie ustalenia tej zależności zilustrowano na rycinie 29.



Rycina 29

Korelacja wartości stężenia laktoferyny w kale ze stężeniem fibrynogenu ($r=0,25$)

W tabeli 8 przedstawiono wyniki wszystkich klasycznych parametrów stanu zapalnego, uzyskane w grupie dzieci chorych.

Tabela 8

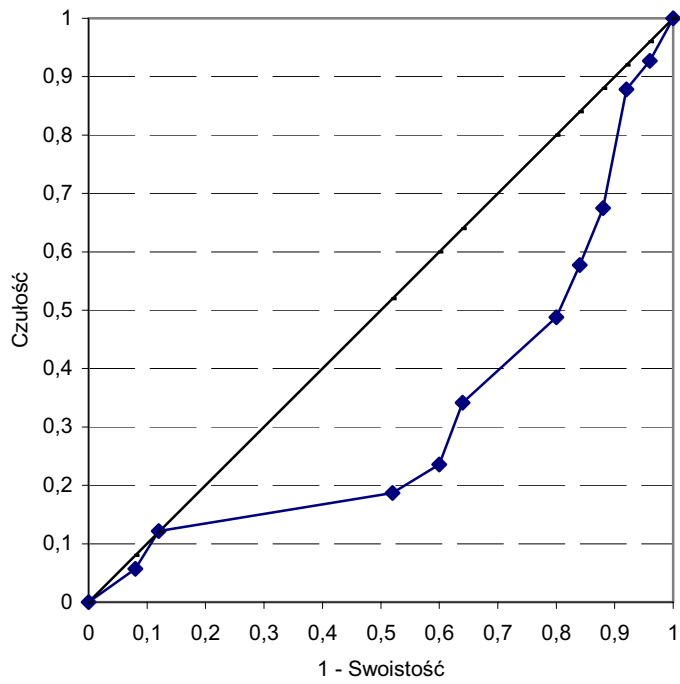
Wartości klasycznych parametrów stanu zapalnego uzyskane u dzieci chorych

Parametr stanu zapalnego	Liczba badań	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
CRP (mg/dl)	123	9,24	1,90	0,10	259,00	27,25
OB (mm/h)	123	17,3	12,0	1,0	105,0	16,63
LEU (tys/mm ³)	123	9,36	8,53	3,67	35,50	4,38
GRAN (tys/mm ³)	123	5,90	5,19	1,30	23,07	3,42
PLT (tys/mm ³)	123	358,9	334,0	122,0	860,0	137,84
FIBR (mg/dl)	123	3,48	3,39	1,20	7,28	0,92

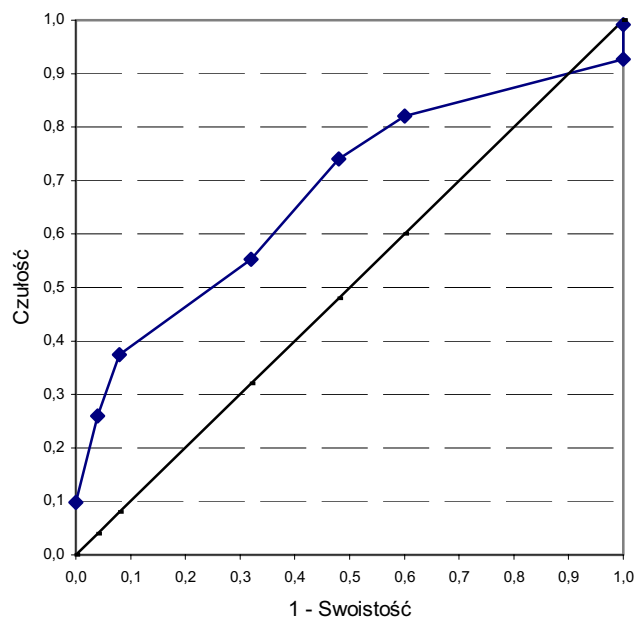
Następnie w celu porównania czułości uznanych markerów stanu zapalnego i oznaczania stężenia laktoferyny w kale, dla stężenia białka C-reaktywnego (CRP) i odczynu opadania krwinek czerwonych (OB) wykreślono krzywe ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) (rycina 30 i 31).

Dla obu parametrów obliczono pole powierzchni pod krzywą (AUC), które wynosiło 0,389 dla CRP (rycina 30) i 0,653 dla OB (rycina 31).

Natomiast pole powierzchni pod krzywą (AUC) dla laktoferyny było znacznie większe (0,89) (rycina 5), co oznacza, że ocena tego parametru charakteryzuje się większą czułością i swoistością w rozgraniczaniu osób ze stanem zapalnym jelita od osób zdrowych.



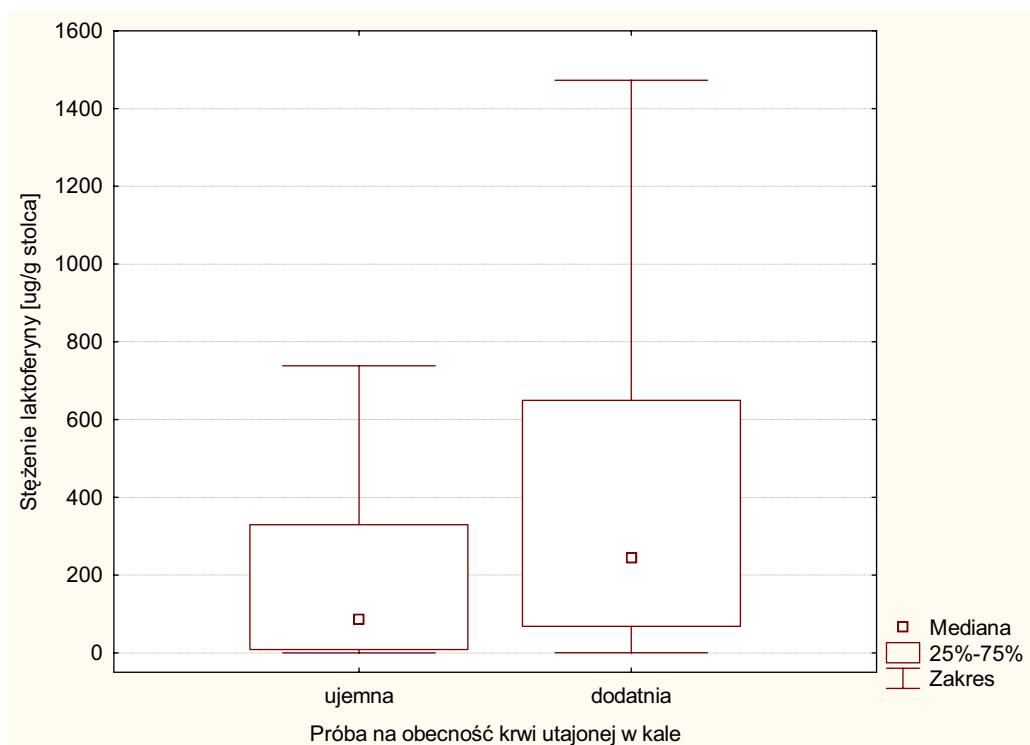
Rycina 30
 Krzywa ROC dla CRP (AUC 0,389)



Rycina 31
 Krzywa ROC dla OB (AUC 0,653)

Ponadto osobnej analizie poddano ewentualną zależność stężenia laktoferyny w kale od obecności krwi utajonej w badanych próbkach kału dzieci chorych.

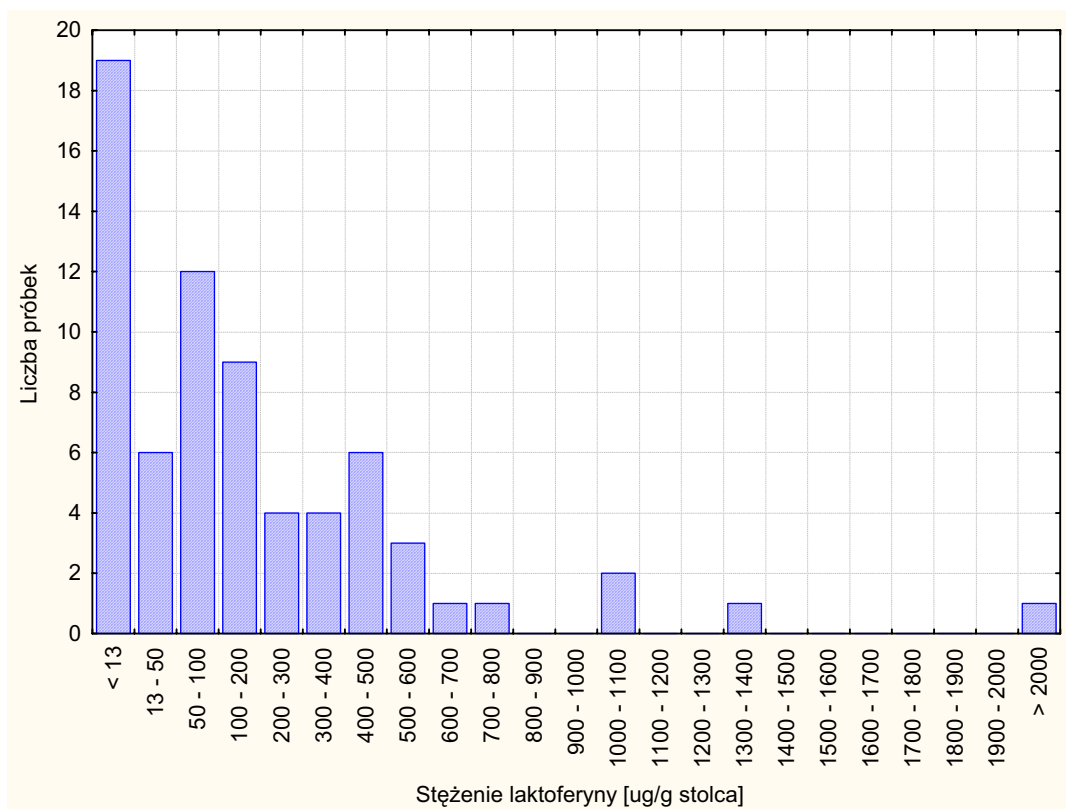
Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych, u których próba na krew utajoną była ujemna mieściło się w zakresie 0,01-2032,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $230,90 \pm 350,92$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 86,76 $\mu\text{g/g}$ stolca) i było statystycznie znacznie niższe ($p < 0,005$) niż u dzieci z wynikiem pozytywnym (rycina 32). W tej grupie poziom laktoferyny w kale wahał się od 0,31 do 2080,00 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $468,59 \pm 548,96$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 244,11 $\mu\text{g/g}$ stolca).



Rycina 32

Stężenie laktoferyny w kale u dzieci chorych w zależności od wyniku próby na obecność krwi utajonej w kale ($p < 0,005$)

Szczegółowej analizie poddano grupę pacjentów, u których próba na obecność krwi utajonej w kale była ujemna. Jedynie w 19 próbkach (27,5%) stężenie laktoferyny w kale było prawidłowe (rycina 33). Natomiast wykazano, że aż w 50 przypadkach (72,5%) z tej grupy, mimo ujemnego badania na obecność krwi utajonej w kale, poziom laktoferyny był podwyższony. W większości stężenie to mieściło się w zakresie niższym niż 600 $\mu\text{g/g}$ stolca. A tylko w pojedynczych próbkach było większe.

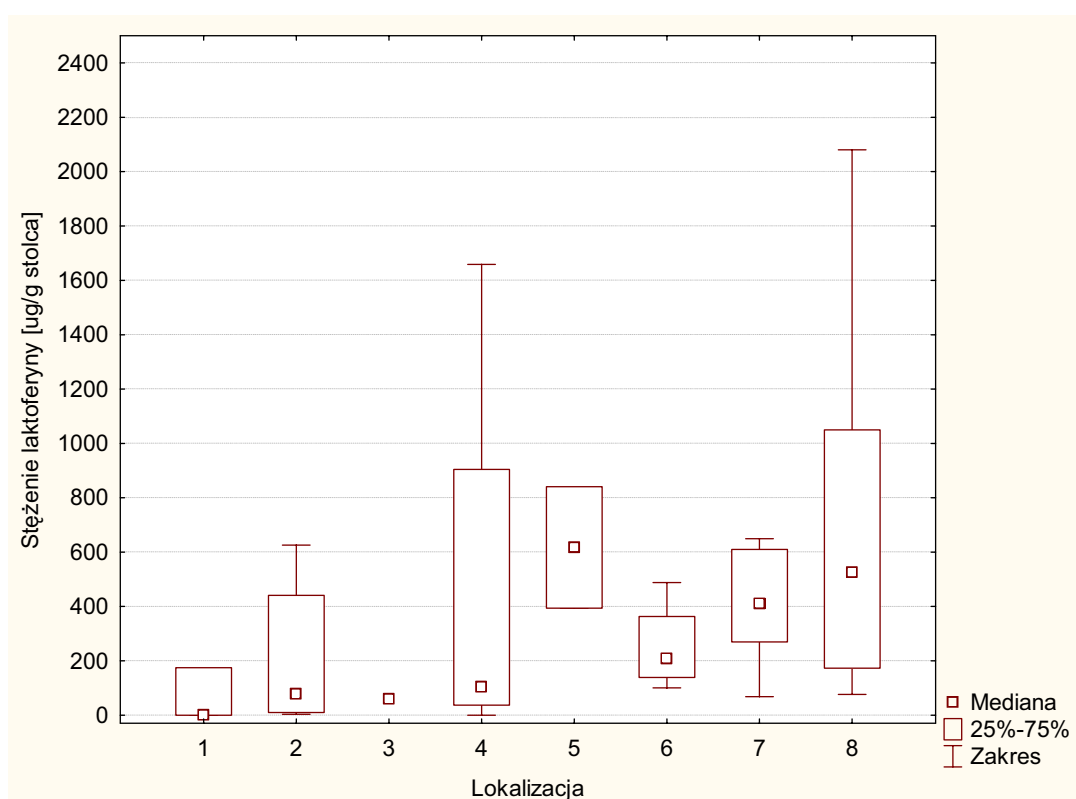


Rycina 33

Porównanie liczby otrzymanych wyników w poszczególnych przedziałach wartości stężenia laktoferyny w kale u pacjentów z ujemnym wynikiem badania w kierunku obecności krwi utajonej w kale

4. 5. 6. Stężenie laktoferyny w kale a lokalizacja zmian chorobowych w grupie dzieci chorych

Następnie poszukiwano zależności między stężeniem laktoferyny w kale a umiejscowieniem zmian chorobowych w jelicie u dzieci z NZJ. W badaniu kolonoskopowym zmiany chorobowe w jelicie uwidoczniono w 8 lokalizacjach, przy tym w 3 z nich były one rozległe. Próbę ustalenia powyższej zależności zilustrowano na rycinie 34.



Rycina 34

Stężenie laktoferyny w kale w zależności od lokalizacji zmian zapalnych (1 – bez zmian endoskopowych; 2 – lewa połowa okrężnicy; 3 – prawa połowa okrężnicy; 4 – całe jelito grube; 5 – całe jelito grube i końcowy odcinek jelita cienkiego; 6 – prawa połowa okrężnicy, zastawka krętniczno-kątnicza, końcowy odcinek jelita cienkiego; 7 – całe jelito grube, zastawka krętniczno-kątnicza, końcowy odcinek jelita cienkiego, 8 – całe jelito grube, zastawka krętniczno-kątnicza)

Dokładne wartości stężenia laktoferyny w kale w zależności od umiejscowienia zmian zapalnych jelita, stwierdzonego w badaniu kolonoskopowym przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9

Wartości stężenia laktoferyny w kale ($\mu\text{g/g}$ stolca) w zależności od lokalizacji zmian zapalnych w jelicie

Lokalizacja zmian zapalnych w jelicie	Liczba próbek	Stężenie laktoferyny w kale ($\mu\text{g/g}$ stolca)				
		średnia	mediana	min	max	odch. std.
1	6	182,68	0,71	0,10	919,20	367,52
2	25	392,78	78,60	3,52	2032,80	597,69
3	1	58,88	58,88			
4	12	480,68	104,78	0,40	1658,40	627,62
5	2	617,38	617,38	393,96	840,80	315,96
6	4	251,30	208,11	100,90	488,10	167,60
7	9	483,26	409,92	68,44	1272,80	359,20
8	5	780,59	524,10	76,16	2080,00	820,41

Stężenie laktoferyny w kale nie różniło się statystycznie istotnie w poszczególnych lokalizacjach zmian chorobowych ($p > 0,05$) (rycina 34).

4. 6. Podsumowanie wyników

1. **Wartości stężenia laktoferyny oznaczone w kale pobranym od dzieci chorych były wyższe od wartości uzyskanych u dzieci z grupy porównawczej ($p < 0,001$).**
2. Nie wykazano zależności między stężeniem laktoferyny w kale u dzieci chorych a płcią ($p = 0,496$) ani wiekiem ($r = 0,14$) badanych dzieci.
3. Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie między wartością stężenia laktoferyny w kale u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna ($p = 0,211$).
4. Nie wykazano zależności między stężeniem laktoferyny w kale a klasycznymi markerami stanu zapalnego.
5. **Wykazano zależność między stężeniem laktoferyny w kale a stopniem aktywności klinicznej choroby u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna.**
6. **Wykazano zależność między stężeniem laktoferyny a nasileniem zmian endoskopowych ($p = 0,043$) u dzieci chorych.**
7. Nie wykazano zależności między stężeniem laktoferyny w kale a lokalizacją zmian zapalnych u dzieci chorych.
8. W grupie porównawczej ustalono wartości referencyjne dla stężenia laktoferyny w kale, mieszczące się w zakresie od 0 do 13 $\mu\text{g/g}$ stolca.

5. DYSKUSJA

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) to grupa przewlekłych schorzeń zapalnych o przebiegu cechującym się występowaniem okresów zaostrzeń i remisji. Obecnie NZJ są coraz częściej rozpoznawane u dzieci.

Od wielu lat naukowcy zajmujący się NZJ poszukują parametru oznaczanego w stolcu, który umożliwiłby wczesne rozpoznawanie i monitorowanie przebiegu choroby. Laktoferyna jest jednym z wielu białek, wydalanych do światła jelita, których poziom rośnie na skutek stanu zapalnego błony śluzowej jelita. Oznaczenie stężenia laktoferyny przynosi wiele korzyści. Laktoferyna oznaczana jest w stolcu, gdzie znajdują się substancje wydzielane przez komórki zmienione zapalnie, w miejscu, gdzie występują zmiany chorobowe jelita. Zatem wartość jej stężenia odzwierciedla nasilenie lokalnych zmian zapalnych, a nie uogólnionego procesu, jak to ma miejsce w przypadku wielu klasycznych parametrów stanu zapalnego, badanych we krwi (54). Po drugie badanie to należy do badań całkowicie nieinwazyjnych, co jest niezwykle istotne u pacjentów przewlekle chorych, a szczególnie u dzieci. Badanie klasycznych parametrów stanu zapalnego wiąże się z koniecznością pobrania krwi. Procedura ta naraża dziecko na stres (54). „Złoty standard” w rozpoznawaniu NZJ, do którego zalicza się badanie kolonoskopowe z oceną histopatologiczną błony śluzowej jelita, jest badaniem inwazyjnym, które u dzieci winno być wykonywane w znieczuleniu ogólnym. Niesie to ryzyko wystąpienia powikłań znieczulenia, a także podnosi koszt diagnostyki. Po trzecie pobranie materiału do badań (stolca) jest niezwykle proste i może być wykonane przez rodziców czy samego pacjenta (54).

W 2007 roku *Schoepfer i wsp.* u chorych z NZJ, u których oceniali parametry stanu zapalnego oznaczane w kale, przeprowadzili ankietę na temat akceptacji tej formy badania (93). Wykazano, że 95% badanych nie miało żadnych problemów z pobraniem materiału, a tylko 5% pacjentów twierdziło, że miało niewielkie trudności. Wśród ankietowanych w cytowanej pracy byli tylko chorzy dorośli. W grupie pacjentów pediatrycznych, w znaczącej części, materiał do badań pobierają rodzice lub opiekunowie.

Laktoferyna jest wykładnikiem stanu zapalnego. Jej stężenie w kale jest podwyższone także w innych chorobach, których istotą jest obecność stanu zapalnego jelita. Wśród nich wymienić należy biegunki o etiologii bakteryjnej czy zmiany zapalne towarzyszące nowotworom jelita grubego (94). Ponadto laktoferyna wydzielana jest przez komórki gruczołu piersiowego do mleka, dlatego też jej stężenie w kale może być podwyższone u zdrowych niemowląt i małych dzieci karmionych naturalnie (50).

Proces zapalny w NZJ dotyczy błony śluzowej i warstwy podśluzowej jelita we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego lub całej grubości ściany jelita w chorobie Leśniowskiego-Crohna (95). Typowe zmiany stwierdzone w badaniu histopatologicznym we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego to zaburzenie architektoniki błony śluzowej, skrócenie krypt i ich nieregularne rozgałęzienia. Ponadto obecne są nacieki z granulocytów obojętnochłonnych i tzw. ropnie krypt (95). W chorobie Leśniowskiego-Crohna proces zapalny dotyczy całej grubości jelita i przebiega z jej pogrubieniem. W badaniu histopatologicznym stwierdza się ziarniniaki, zawierające wielojądrowe komórki olbrzymie oraz nacieki zapalne z limfocytów a w okresie zaostrzenia choroby, także z granulocytów obojętnochłonnych (95). Nierzadko mogą tworzyć się ropnie. Zatem zarówno we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, jak i w chorobie Leśniowskiego-Crohna, do ściany jelita napływają aktywowane granulocyty obojętnochłonne, a do jego światła wydalane są produkowane przez nie białka. W związku z powyższym, zrozumiałe jest szerokie zainteresowanie naukowców znalezieniem badania, które będzie odzwierciedleniem liczby leukocytów w stolcu. Pierwotnie podejmowano próby bezpośredniej oceny liczby krwinek białych w stolcu, ale wadą tego oznaczenia była konieczność wykonywania badania ze świeżo pobranego materiału biologicznego oraz subiektywizm oceny mikroskopowej (96). Wobec powyższego ocena liczby leukocytów w kale nie jest obecnie w praktyce klinicznej powszechnie wykonywana i wydaje się, że może zostać zastąpiona oznaczeniem stężenia laktoferyny w kale, która jest produktem pobudzonych granulocytów obojętnochłonnych (55).

Pierwsza wzmianka na temat oznaczania stężenia laktoferyny w kale pochodzi z 1992 roku. *Guerrant i wsp.* przedstawili badanie, w którym oznaczano stężenie laktoferyny u chorych z biegunką o potwierdzonej etiologii bakteryjnej (*Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*). Wykazano, że jest ono podwyższone u pacjentów z

wysoką liczbą leukocytów w stolcu (96). Doniesienie to stało się inspiracją do dalszych badań, w których analizowano kliniczną przydatność oznaczania stężenia laktoferyny w kale w różnicowaniu biegunek o etiologii bakteryjnej od biegunek o etiologii wirusowej (46,47,97,98,99).

Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale zostało w 2003 roku zaakceptowane przez amerykańską *Food and Drug Administration* jako metoda umożliwiająca stwierdzenie obecności stanu zapalnego w jelicie (51).

W 2000 roku *Nielsen i wsp.*, w analizie dotyczącej wykładników aktywności choroby w NZJ, poruszyli problem znalezienia idealnego markera, który byłby czuły i specyficzny, pozwoliłby na wytypowanie osób z grupy ryzyka rozwoju choroby, umożliwiłby monitorowanie przebiegu schorzenia i kontrolę wyników jego leczenia. W codziennej praktyce klinicznej brak jest takiego markera, którego oznaczenie byłoby nieinwazyjne, łatwe w wykonaniu i tanie (100). Rolę takiego wskaźnika mogłoby pełnić właśnie oznaczanie stężenia laktoferyny w kale. Pionierskie doniesienie dotyczące przydatności oznaczania laktoferyny w kale u pacjentów z NZJ pochodzi z Japonii z 1993 roku (101). W kolejnych latach opublikowano dane pochodzące z innych ośrodków (38,55,102). Przełomowe znaczenie dotyczące tego zagadnienia miała publikacja *Kane i wsp.*, którzy badali pacjentów z NZJ oraz chorych z zespołem jelita drażliwego. Poziomy laktoferyny w kale były znamienne wyższe w pierwszej grupie badanych (51). Dalsze badania potwierdziły przydatność oznaczania laktoferyny w kale u pacjentów z NZJ (90,94,103,104), jednak wszystkie dotyczyły pacjentów dorosłych.

Wobec narastającej liczby dzieci z NZJ, trudności w diagnostyce oraz w monitorowaniu terapii, konieczności powtarzania inwazyjnych badań diagnostycznych, w niniejszej pracy badano poziomy laktoferyny w kale w tej grupie chorych i przeprowadzono analizę mającą na celu ocenę przydatności tego badania w praktyce klinicznej.

W związku z brakiem w piśmiennictwie danych na temat wartości referencyjnych stężenia laktoferyny w kale w wieku rozwojowym, w pracy własnej podjęto próbę ustalenia normy dla tego oznaczenia. Do grupy porównawczej zakwalifikowano 41 dzieci. Stężenia laktoferyny w kale mieściły się w zakresie od 0,26 do 18,80 $\mu\text{g/g}$ stolca

(średnia 3,65 µg/g stolca). Wartość poziomu odcięcia (*cut-off*) wynosiła 13 µg/g stolca. Producent testu komercyjnego jako normę stężenia laktoferyny w kale podaje wartości od 0 do 7,24 µg/g stolca, są to jednak zalecenia oparte o badania dorosłych.

Wartości uznane, przez innych autorów, jako referencyjne są zróżnicowane (51,54,58,89,103,104,105), ale zwykle mieszczą się poniżej 10 µg/g stolca. Część badaczy do grupy kontrolnej kwalifikowała wyłącznie osoby zdrowe (51,54,58,103,105), inne badania dotyczyły także pacjentów z zespołem jelita drażliwego (89,104). Najniższe wartości poziomu odcięcia wynoszące 2,25 i 2,11 µg/g stolca uzyskali *Kane i Walker* (51,54), nieco wyższe *Hirata, Schoepfer i Dai* – 5,96; 4,00 i 6,35 µg/g stolca (58,103,105). Spośród powyżej cytowanych autorów, tylko *Walker i wsp.* badali dzieci (54), jednak grupa kontrolna w tej analizie była nieliczna (N=22). W badaniach *Hirata i wsp.* ustalono także stosunkowo niskie wartości referencyjne, może to jednak być wynikiem wykorzystania innego zestawu testów do oznaczania laktoferyny w kale (58).

Na podstawie wyznaczonego poziomu odcięcia (*cut-off*) obliczono czułość i swoistość oznaczania poziomu laktoferyny w kale w rozpoznawaniu NZJ. W niniejszym badaniu wyniosły one odpowiednio 78,86% i 92,10%. Są to wyniki wskazujące na dużą przydatność tego oznaczenia w praktyce klinicznej. Otrzymane wyniki są także porównywalne z opublikowanymi przez innych autorów. Spośród tych analiz, w których do grupy kontrolnej kwalifikowano wyłącznie osoby zdrowe, *Fine i wsp.* uzyskali czułość 90% i swoistość 98% (55), a *Kane i wsp.* czułość 78% i swoistość 90% (51). Natomiast *Schoepfer i Langhorst* porównywali grupę pacjentów z NZJ z pacjentami z zespołem jelita drażliwego. W ich badaniach czułość i swoistość wynosiły odpowiednio 86% i 100% w badaniu *Schoepfera i wsp.* (93) oraz 85% i 77,2% w badaniu *Langhorsta i wsp.* (89).

W 2007 roku *Walker i wsp.* opublikowali podsumowanie jedynej dotychczas dostępnej analizy, dotyczącej oznaczania stężenia laktoferyny w kale u dzieci i młodzieży z NZJ. Uzyskane przez nich wyniki wykazały bardzo wysoką czułość i swoistość testu, wynoszące odpowiednio 97% i 100% (54). Być może tak dobre rezultaty wynikają z faktu, iż powyższe parametry zostały obliczone w oparciu o bardzo niską wartość poziomu odcięcia, a grupa porównawcza w tym badaniu była, jak już wspomniano, nieliczna (N=22) (54).

Celem oceny jakości testu w niniejszym badaniu wykreślono krzywą ROC (*Receiver Characteristic Curve*) oraz obliczono pole powierzchni pod tą krzywą (AUC, *Area Under Curve*). Krzywa ROC służy do oceny testu jako parametru różnicującego wyniki prawidłowe od nieprawidłowych. Pole powierzchni pod krzywą (AUC) mieści się w granicach od 0 do 1. Im wynik jest bliższy jedności, tym lepsza wartość diagnostyczna testu. W badaniach własnych pole powierzchni pod krzywą (AUC) wyniosło 0,89. Jest to rezultat porównywalny z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i świadczy o stosunkowo wysokiej wartości tego testu diagnostycznego (53,54,104).

Średnie stężenie laktoferyny u dzieci chorych w badaniach własnych wyniosło $335,25 \pm 462,15$ $\mu\text{g/g}$ stolca i było statystycznie znamienne wyższe od wartości w grupie porównawczej ($p < 0,001$). Powyższe wyniki są zgodne z obserwowanymi przez innych autorów (51,54,89,93). W dostępnym piśmiennictwie znaleziono tylko jedną pracę analizującą powyższy problem w populacji dziecięcej (54). Należy jednak podkreślić, że średnie stężenia laktoferyny w cytowanych pracach różniły się znacznie. Badania *Walkera i wsp.* wykazały bardzo wysoką średnią wartość laktoferyny w kale w NZJ, równą niemal 2000 $\mu\text{g/g}$ stolca, (54). Przyczyna uzyskania tak wysokich wartości może wynikać z faktu, że ponad połowa pacjentów została zakwalifikowana do badania w aktywnym stadium choroby. Natomiast poziomy laktoferyny w NZJ, w analizie przeprowadzonej przez *Kane i wsp.*, były bardziej zbliżone do uzyskanych w niniejszej pracy (51). Zupełnie odmienne wyniki przedstawili w 2007 roku autorzy niemieccy (104), u których uzyskane wartości były znacznie niższe, zaś najwyższe poziomy laktoferyny mieściły się w zakresie między 300 a 500 (mediana <70 $\mu\text{g/g}$ stolca). Autorzy nie przedstawili jednak szczegółowej charakterystyki pacjentów.

W pracy własnej podjęto próbę zróżnicowania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohna na podstawie poziomu laktoferyny w kale. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy między wynikami uzyskanymi w obu podgrupach. Dane z piśmiennictwa dotyczące porównania stężenia laktoferyny w kale u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna są nieliczne, a wyniki, które uzyskano, nie są jednoznaczne. *Kane i wsp.* w badaniach z 2003 roku wykazali, że średnie stężenie oznaczone u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego było prawie trzy razy wyższe od stężenia u pacjentów z

chorobą Leśniowskiego-Crohna (51). Jednak inni badacze nie potwierdzili istnienia tej różnicy (54). W związku z tym powyższe zagadnienie wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Niezwykle istotne jest dokładne zdefiniowanie porównywanych grup, szczególnie pod względem stopnia aktywności klinicznej choroby.

Niezmiernie interesująca, z klinicznego punktu widzenia, byłaby możliwość wykorzystania oznaczania stężenia laktoferyny w kale do pośredniego określenia nasilenia zmian chorobowych w jelicie. W związku z powyższym, w badaniach własnych poszukiwano zależności między stężeniem laktoferyny w kale a stopniem nasilenia zmian endoskopowych, sklasyfikowanych według czterostopniowej skali (89). Obserwowano wzrost stężenia laktoferyny wraz ze wzrostem nasilenia tych zmian. Były to różnice statystycznie znamienne, podobnie jak w badaniach innych autorów (54,89). Należy jednak zaznaczyć, że poszczególni badacze stosowali różne skale określające stopień nasilenia zmian endoskopowych, co utrudnia pełne porównanie uzyskanych wyników. Najczęściej korzystano ze skal uproszczonych (89,106), rzadziej ze skal z podziałem na dwie grupy: wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna (53), a sporadycznie zaś ze skal dokładnych, uwzględniających różne lokalizacje zmian (107).

W badaniach własnych na uwagę zasługują wyniki uzyskane u dwóch pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, u których badanie kolonoskopowe nie wykazało odchyień, a stężenie laktoferyny w kale było podwyższone. Prawdopodobnie było to spowodowane obecnością zmian zapalnych w jelicie cienkim, niedostępnych klasycznemu badaniu endoskopowemu. Uzyskanie takiego wyniku, przy dobrej kondycji ogólnej pacjenta i prawidłowym obrazie w endoskopii powinno skłonić lekarza do poszukiwania zmian zapalnych w innym odcinku przewodu pokarmowego, niedostępnym metodom obrazowym używanym w codziennej praktyce

W piśmiennictwie dotyczącym przydatności oznaczania poziomu białek wydzielanych przez granulocyty obojętnochłonne do światła jelita u pacjentów z NZJ, analizowana jest korelacja stężenia tych białek w kale ze wskaźnikami aktywności klinicznej choroby. Wskaźniki te zostały powszechnie zaakceptowane, w celu umożliwienia jednolitej, porównywalnej oceny stanu klinicznego pacjentów. Pozwalają one na porównanie poszczególnych chorych oraz na ocenę przebiegu choroby u jednego pacjenta w toku długofalowej obserwacji. W diagnostyce NZJ uznanych jest kilka

wskaźników aktywności klinicznej. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna stosuje się Indeks Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna (CDAI – *Crohn Disease Activity Index*) (108), który u dzieci zmodyfikowano na Pediacyjny Indeks Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna (PCDAI - *Pediatric Crohn Disease Activity Index*) (109). Natomiast u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego do oceny przebiegu klinicznego choroby stosuje się skalę Truelove-Wittsa (110). Inne rzadziej stosowane wskaźniki, to popularne w Stanach Zjednoczonych wskaźniki Harvey-Bradshaw (oddzielny dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i dla choroby Leśniowskiego-Crohna) (111) oraz wskaźnik Mayo (103).

W niniejszych badaniach podjęto próbę analizy zależności stężenia laktoferyny w kale od stopnia aktywności klinicznej choroby ocenianej według wskaźnika Truelove-Wittsa u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz od PCDAI u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna. U dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wartości stężenia laktoferyny w kale w podgrupie z umiarkowaną postacią choroby były wyższe niż w podgrupie z łagodną postacią choroby. Podgrupy z ciężką postacią choroby, ze względu na małą liczebność (N=2), nie poddano analizie. Natomiast w grupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna żadnego pacjenta nie zakwalifikowano do podgrupy z ciężką postacią choroby, a poziomy u dzieci z umiarkowaną postacią choroby były wyższe od tych, które stwierdzono u dzieci z postacią łagodną.

Poszukiwania podobnych zależności prowadzone były również przez innych badaczy. Wyniki przez nich uzyskane nie są jednoznaczne. W 2003 roku *Kane i wsp.* wykazali zależność stężenia laktoferyny w kale od stopnia aktywności klinicznej choroby. Autorzy korzystali ze wskaźników aktywności choroby uwzględniających wyłącznie objawy kliniczne (51). Podobne spostrzeżenia poczynili *Walker i wsp.* W badaniu opublikowanym w 2007 przeprowadzili bardzo dogłębną analizę zależności między stężeniem laktoferyny w kale a wskaźnikami aktywności klinicznej choroby. Oznaczenia wykonano w podgrupach pacjentów będących w aktywnym i nieaktywnym stadium choroby. Identyfikacja stopnia aktywności klinicznej choroby została przeprowadzona zgodnie z Pediacyjnym Indeks Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna (PCDAI), następnie według wskaźnika Harvey-Bradshaw, skali Kozarek dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego oraz ogólnego wskaźnika lekarskiego (PGA – *Physician's Global Assessment*). Wykazano zależność stężenia laktoferyny w kale od stopnia aktywności klinicznej, ocenianej na podstawie wyżej

wymienionych wskaźników (54). Również badania *Schoepfera i wsp.* wykazały zależność między poziomem laktoferyny w kale a Indekssem Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna (CDAI). Jednak w tym samym badaniu u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stwierdzono brak korelacji ze stopniem aktywności choroby sklasyfikowanym według wskaźnika Mayo (93). Doniesienia naukowców fińskich potwierdziły także zależność stężenia laktoferyny od stopnia aktywności choroby, ustalonego zgodnie z Indekssem Aktywności Choroby Leśniowskiego-Crohna (CDAI) (94).

Odmienne dane przedstawili autorzy niemieccy, zarówno u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego nie wykazali podobnych zależności (104). W związku z tak dużym zróżnicowaniem opublikowanych wyników wydaje się, że kwestia istnienia ewentualnej zależności między wskaźnikami aktywności klinicznej a poziomem laktoferyny w kale pozostaje nadal otwarta i wymaga dalszych badań przeprowadzonych w większych grupach chorych.

Interesującą analizę przeprowadzili *Lim i wsp.*, badając grupę pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego po resekcji jelita grubego i prostnicy. Wykazali oni korelację między indeksem aktywności klinicznej zapalenia błony śluzowej okolicy zespolenia jelita a stężeniem laktoferyny w kale (112).

Wśród otrzymanych, w niniejszej pracy, wyników warte podkreślenia są dane uzyskane u pacjentów z niższym stopniem aktywności klinicznej choroby (ryc. 19, 21, 22). Dotyczy to zarówno pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jak i choroba Leśniowskiego-Crohna. W podgrupie chorych z łagodną postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego podwyższone stężenie laktoferyny w kale stwierdzono aż w 30 przypadkach (71,4%), u pacjentów z nieaktywną klinicznie postacią choroby Leśniowskiego-Crohna w 31 (86,1%), a u osób z łagodną postacią tej choroby w 11 przypadkach (84,6%).

Wydaje się, że u tych pacjentów, pomimo dobrego stanu klinicznego, lokalnie w jelicie nadal toczy się proces zapalny. Powyższe analizy mogą sugerować brak pełnej zbieżności indeksów aktywności klinicznej ze zmianami zapalnymi w jelicie. Wskaźniki te, choć uznane, nie są idealnym wykładnikiem aktywności procesu chorobowego. Spostrzeżenia takie poczynili już w 1999 roku *van der Sluys Veer i wsp.*, którzy podkreślali brak całkowitego obiektywizmu indeksów aktywności klinicznej

(113). W skalach tych bowiem ocenia się między innymi: ogólne samopoczucie czy też dolegliwości bólowe brzucha, które są zawsze oceną subiektywną, zależną od indywidualnego progu bólowego pacjenta.

Podobne obserwacje poczynili także inni autorzy, którzy zgadzają się z poglądem, że istnieje grupa pacjentów w nieaktywnym stadium klinicznym choroby, u których stężenie laktoferyny w kale jest podwyższone (51,54,93,94,105).

Należy więc zadać pytanie, jak postępować z takimi chorymi? W pracy dotyczącej markerów laboratoryjnych choroby w NZJ *Lundberg i wsp.* przedstawili stopniową zmianę poglądów na temat terapii tych schorzeń (114). Początkowo opowiadano się za leczeniem wyłącznie pacjentów z klinicznymi objawami choroby; brak objawów klinicznych uznawany był za remisję. Obecnie uważa się jednak, że należy kontynuować leczenie pomimo ustąpienia objawów. Udowodniono, że długotrwałe stosowanie w czasie remisji sulfosalazyny lub kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) znacząco zredukowało liczbę nawrotów choroby we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (114), a w konsekwencji obniżyło także ryzyko wystąpienia raka jelita grubego u tych pacjentów (115).

Podobna sytuacja miała miejsce u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, u których stosowanie azatiopryny doprowadziło do zmniejszenia ogólnej liczby powikłań, takich jak ropnie czy przetoki (116).

Od dawna znany jest fakt, iż remisja kliniczna choroby nie zawsze znajduje potwierdzenie w badaniu endoskopowym czy mikroskopowym jelita (116). Stąd też zachodzi potrzeba stałego monitorowania przebiegu choroby w taki sposób, który umożliwiałby uchwycenie nawet niewielkich zmian zapalnych jelita, jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych (114). Dotychczas w praktyce klinicznej możliwość dokładnego śledzenia aktywności procesu zapalnego dostarczało przede wszystkim badanie kolonoskopowe i histopatologiczne jelita. W niektórych ośrodkach wykonuje się w tym celu również badanie scyntygraficzne jelita (85). Jednakże cena, czasochłonność, a przede wszystkim inwazyjność tych badań stanowią wyraźną barierę w wykorzystywaniu ich do monitorowania przebiegu choroby.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w niniejszym badaniu oraz wyniki uzyskane przez innych autorów, wydaje się, iż rolę markera stanu zapalnego w NZJ mogłoby pełnić oznaczenie stężenia laktoferyny w kale. Postępując zgodnie z otrzymanymi wynikami, pacjentów, u których nie obserwuje się objawów klinicznych choroby, a u

których wykazano podwyższone stężenie laktoferyny w kale, nie można uznać za będących w pełnej remisji.

W codziennej diagnostyce i monitorowaniu przebiegu NZJ zasadniczą rolę pełni oznaczanie podstawowych parametrów określających nasilenie stanu zapalnego, takich jak: stężenie białka c-reaktywnego w surowicy krwi (CRP), odczyn opadania krwinek czerwonych (OB), liczba krwinek białych krwi, liczba granulocytów obojętnochłonnych czy liczba płytek krwi. Wobec powyższego w niniejszym badaniu podjęto próbę określenia zależności między stężeniem laktoferyny w kale a klasycznymi parametrami stanu zapalnego. W analizie uwzględniono dodatkowo stężenie fibrynogenu w osoczu oraz badanie na obecność krwi utajonej w kale. Uzyskane wyniki wykazały brak korelacji między wyżej wymienionymi parametrami oznaczanymi we krwi a stężeniem laktoferyny w kale. Stwierdzono natomiast wyższe stężenia laktoferyny u pacjentów z dodatnim wynikiem badania w kierunku obecności krwi utajonej w kale.

Większość doniesień opublikowanych na ten temat przez innych autorów była odmienna. Badania przeprowadzone przez naukowców amerykańskich wykazały korelację między poziomem laktoferyny a następującymi parametrami: stężeniem białka c-reaktywnego, odczynem sedimentacji krwinek czerwonych, hematokrytem, oraz liczbą płytek krwi (54). Wartym podkreślenia jest jednak fakt, iż oznaczanie stężenia laktoferyny w kale w porównaniu z wymienionymi powyżej parametrami, cechowało się wyższą czułością w rozpoznawaniu NZJ (54). Podobne obserwacje poczynili badacze szwajcarscy, którzy porównywali czułość i swoistość testu na obecność laktoferyny i innych badań w różnicowaniu pacjentów z NZJ i zespołem jelita drażliwego. Czułość i swoistość oznaczania stężenia laktoferyny w kale (86% i 100%) były zdecydowanie wyższe od czułości i swoistości oznaczania liczby leukocytów we krwi obwodowej (47% i 90%) i oznaczania stężenia białka c-reaktywnego (64% i 85%) (94). Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz wyniki własne wydaje się, iż być może rutynowa ocena laktoferyny w stolcu byłaby przydatna w monitorowaniu przebiegu NZJ. Obecnie uważa się, że przewaga oznaczania parametrów stanu zapalnego w stolcu nad badaniem klasycznych markerów stanu zapalnego, oznaczanych we krwi, wynika między innymi z faktu, że określają nasilenie zmian lokalnych, w miejscu choroby. Klasyczne markery stanu zapalnego oznaczane we krwi odzwierciedlają natomiast uogólnioną odpowiedź zapalną, a ponadto są niespecyficzne (95).

Interesującym zagadnieniem, z punktu widzenia klinicznego, jest możliwość prognozowania nawrotu choroby i wdrożenia leczenia jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych (114).

Dotychczas jedynie badanie endoskopowe dawało takie możliwości. Doniesienie *Walkera i wsp.* wskazują, rolę takiego parametru będzie mogło pełnić oznaczenie poziomu laktoferyny w kale. W publikacji z 2003 roku, potwierdzili oni bowiem wzrost poziomu tego białka, wyprzedzający nawrót choroby (54).

Zagadnienie, które dotychczas pozostaje nadal nie rozstrzygnięte, to istnienie ewentualnej zależności między poziomem laktoferyny w kale a lokalizacją zmian zapalnych w jelicie. W niniejszym badaniu podjęto również ten temat, jednakże przeprowadzona analiza nie wykazała obecności takiej zależności.

Poszukiwania podobnych korelacji prowadzone były jedynie przez kilka zespołów badaczy, a uzyskane wyniki są niejednoznaczne i zagadnienie to wymaga z pewnością przeprowadzenia dalszych, dogłębnych analiz, opartych o badania grup o dużej liczebności. W większości dostępnych publikacji nie podejmowano prób korelacji lokalizacji zmian zapalnych jelita z poziomem laktoferyny w kale (54,89,93). Badania *Kane i wsp.* w grupie 104 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i 80 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazały, iż nie ma zależności pomiędzy stężeniem laktoferyny a lokalizacją zmian zapalnych w jelicie u tych chorych (51). Natomiast w 2008 roku *Sipponen i wsp.* w oparciu o materiał pobrany od pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna opublikowali pracę, w której dowiedli, że wyższe stężenia laktoferyny w kale występują u osób, u których zmiany zapalne zlokalizowane są w jelicie grubym (94). Interesujące doniesienie opublikowali *Scarpa i wsp.* Analizowali badanie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, po resekcji fragmentu jelita cienkiego i/lub grubego. Wyższe poziomy laktoferyny w kale stwierdzono u pacjentów, u których zmiany zlokalizowane były w jelicie cienkim i okrężnicy, w porównaniu z tymi, u których zmiany chorobowe obserwowano w okolicy zastawki krętniczno-kątniczej (117).

Poszukiwania zależności między stężeniem laktoferyny w kale a obecnością zmian zapalnych w jelicie prowadzili także *Parsi i wsp.* U pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, po proktokolektomii, z wytworzeniem zbiornika jelitowego i

zespolenia jelitowo-odbytniczego (*ileal-pouch-anal anastomosis*) czułość i swoistość badania wynosiły odpowiednio 100% i 85% (57). Podobne spostrzeżenia poczynili *Lim i wsp.* także u chorych z NZJ po proktokolektomii, uzyskując niemal identyczne wyniki (czułość 100% i swoistość 86%). Ponadto w powyższej publikacji przedstawiono schemat postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u pacjentów po resekcji jelita grubego i z objawami dysfunkcji zespolenia, oparty o oznaczanie poziomu laktoferyny w kale (112).

Badanie kału na obecność laktoferyny posiada również atrybuty wynikające z właściwości fizycznych i chemicznych samego białka. Laktoferyna jest bardzo stabilna, oporna na działanie enzymów trawiennych. Producent testu zaleca wykonanie oznaczenia w ciągu 24 godzin od pobrania materiału biologicznego, a w przypadku braku możliwości wykonania powyższego oznaczenia w podanym czasie, zaleca się zamrożenie pobranego materiału w temperaturze -20°C lub niższej (118). Na stabilność laktoferyny zwracali uwagę już w 1992 roku *Guerrant i wsp.* (96). Kolejni autorzy potwierdzili te doniesienia. Według badań *Boone'a* białko jest stabilne w temperaturze pokojowej przez 5 (119), a według *Kayazawa i wsp.* nawet przez 7 dni (120). W ostatnich latach lekarze japońscy opublikowali badanie, w którym porównywali przydatność oznaczania stężenia laktoferyny i hemoglobiny w kale w chorobach jelita grubego. W badaniu porównano także stabilność obu białek. Wykonywano kilkakrotnie oznaczenia w tej samej próbce materiału biologicznego: bezpośrednio po pobraniu, a następnie w kolejnych dniach jego przechowywania. Wartości stężenia laktoferyny dłużej utrzymywały się na tym samym poziomie, bez względu na sposób przechowywania (59). Pojedyncze doniesienia sugerują, iż wielokrotne rozmrażanie materiału biologicznego nie ma wpływu na wartość oznaczanego stężenia laktoferyny (51).

Jedno z niewielu zastrzeżeń wobec badania stężenia laktoferyny w kale związane jest z ceną jednego oznaczenia. W materiale własnym wyniosła ona 70 złotych, czyli około 33 dolarów. Jest to poważne ograniczenie wobec testu, który miałby służyć jako badanie przesiewowe. Według niektórych danych sugerowana jest cena 20 dolarów (93). Kolejne zastrzeżenie wiąże się z czasochłonnością wykonania oznaczeń, spowodowaną koniecznością wykonania każdorazowo kilku rozcieńczeń materiału biologicznego. Producent zestawu zaleca dwa rozcieńczenia, które należy przygotować

w celu wykonania jednego oznaczenia (1:100 i 1:1000). Jednak zaznacza, że w razie uzyskania wysokiego stężenia laktoferyny, konieczne może być wykonanie kolejnych rozcieńczeń (118). W dostępnym piśmiennictwie tylko pojedynczy autorzy opisali, jakich używano rozcieńczeń. Wśród nich należy wymienić zespoły *Schoepfera i wsp.* oraz *D'Incà i wsp.*, którzy wykonywali oznaczenia przy użyciu roztworu 1:400 (53,93). W niniejszym badaniu wykonano rozcieńczenia 1:100, 1:400, 1:1000, a w kilku przypadkach również 1:4000, co znacząco podniosło koszt badania. Być może do celów przesiewowych bardziej użyteczne mogłyby być testy jakościowe lub ilościowe na obecność laktoferyny w kale, które są obecnie wprowadzane do użycia.

W ostatnich latach notuje się postęp w badaniach nad parametrami stanu zapalnego, oznaczanymi w stolcu. Najczęściej oznaczane białka to kalprotektyna oraz elastaza granulocytów obojętnochłonnych. Pojedyncze doniesienia oparte są o ocenę przydatności oznaczania stężenia w kale kilku białek jednocześnie (89,93). Najnowsze dane sygnalizują możliwości wykorzystania w diagnostyce NZJ oznaczania w stolcu białka S100A12 i M2-kinazy pirogronianowej (122,123,124,125,126).

Pomimo iż szereg wyników badań wskazuje na przydatność oznaczania stężenia w stolcu białek, wydalanych przez granulocyty obojętnochłonne, do chwili obecnej żaden z tych parametrów nie został wprowadzony do rutynowego panelu badań diagnostycznych u pacjentów z NZJ.

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wykazały wysoką czułość i swoistość oznaczania stężenia laktoferyny w kale i zachęcają do wykorzystywania oceny tego parametru w codziennej diagnostyce pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit.

6. WNIOSKI:

1. Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale jest użytecznym wykładnikiem stanu zapalnego, w rozpoznawaniu i monitorowaniu przebiegu NZJ.
2. Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale u pacjentów z NZJ może być wykorzystywane w ocenie stopnia aktywności klinicznej i endoskopowej choroby.
3. Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale jest parametrem o większej czułości od klasycznych parametrów stanu zapalnego w rozpoznawaniu NZJ.
4. Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale nie może służyć jako parametr różnicujący między wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego a chorobą Leśniowskiego-Crohna.
5. Oznaczanie stężenia laktoferyny w kale nie jest pomocne w typowaniu lokalizacji zmian zapalnych w jelicie u pacjentów z NZJ
6. Wartości referencyjne stężenia laktoferyny w kale u dzieci i młodzieży wynoszą poniżej 13 $\mu\text{g/g}$ stolca, niezależnie od płci.

7. Aneks

Załącznik 1

Pediatryczny indeks aktywności choroby Leśniowskiego – Crohna według Hyamsa w modyfikacji Ryżko (PCDAI – pediatric Crohn’s disease activity index)

Bóle brzucha	Brak	0
	Słabe	5
	Silne	10
Stolce (dziennie)	< 2, bez krwi	0
	2-5 luźnych lub ślad krwi	5
	> 5 lub znaczne krwawienie	10
Samopoczucie	Dobre (pełna aktywność)	0
	Nieco gorsze (mniejsza aktywność)	5
	Złe (znaczne ograniczenie aktywności)	10
Stężenie hemoglobiny (g/dl)	> 12	0
	10 – 12	2,5
	< 10	5
OB (mm/godz.)	< 20	0
	20 – 50	2,5
	> 50	5
Stężenie albumin (g/l)	> 35	0
	31 – 35	5
	< 31	10
Wskaźnik Cole’a (%)	> 85	0
	80 – 85	10
	< 85	20
Badanie palpacyjne brzucha	Brak tkliwości i oporu	0
	Nieznaczna tkliwość lub wyczuwalny guz	5
	Wyraźna tkliwość i guz	10
Zmiany okołodbytnicze	Brak	0
	Niewielkie, bez bolesności	5
	Przetoki, bolesność lub ropień	10
Objawy pozajelitowe (gorączka > 38°C, zapalenie jamy ustnej, stawów, skóry itp.)	Brak	0
	Jeden z objawów	5
	Dwa lub więcej	10

Ocena aktywności: 0 – 10 pkt – brak aktywności, 11 – 25 pkt – łagodna postać choroby, 26 – 50 pkt – umiarkowana postać choroby, > 51 pkt – ciężka postać choroby

Załącznik 2

Skala aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego według Truelove – Wittsa w modyfikacji Ryzki

	0 pkt	1 pkt	2 pkt
Stolce biegunkowe	Do 2	2 - 6	> 6
Krew w stolcach	brak	śląd	dużo
temperatura	norma	do 38°C	> 38°C
Stężenie hemoglobiny	> 12 g/dl	10 – 12 g/dl	10 g/dl
OB	< 10	10 - 30	> 30
Wskaźnik Cole'a	> 85 %	80 – 85 %	< 80 %

Ocena aktywności:

0 – 4 pkt: łagodny rzut choroby

5 – 8 pkt: umiarkowany rzut choroby

9 – 12 pkt: ciężki rzut choroby

Załącznik 3

Informacja o badaniu oraz świadoma zgoda pacjenta

Tytuł badania: „Laktoferyna w kale jako wykładnik aktywności procesu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci”.

Imię i nazwisko pacjenta:.....

Data urodzenia.....Płeć.....

Adres.....

Szanowni Państwo

Celem niniejszego badania klinicznego jest ocena przydatności pomiaru stężenia laktoferyny w kale w rozpoznawaniu i kontroli nieswoistych zapaleń jelit, czyli choroby Leśniowskiego-crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

Badanie polega na pobraniu próbki stolca, następnie zmierzeniu stężenia laktoferyny.

Wynik zostanie skorelowany z wynikami rutynowo wykonywanych badań kontrolnych.

Badanie to należy do grupy tzw. badań nieinwazyjnych, **nie wymaga** prowokacji oddania stolca, ani **nie wymaga** pobrania krwi. **Nie niesie za sobą żadnego ryzyka.**

Korzyści związane z udziałem Państwa Dziecka w niniejszym badaniu klinicznym to przyczynienie się do wynalezienia prostego badania kontrolnego w nieswoistych zapaleniach jelit, nie wymagającego pobierania krwi.

Dokładne dane personalne Państwa Dziecka zostaną objęte tajemnicą lekarską.

Dokładna ocena danych końcowych będzie anonimowa.

Udział w badaniu jest dobrowolny.

Zapoznałam/zapoznałem się z powyższą informacją, miałam/miałem możliwości uzyskania szerszych informacji oraz zadawania pytań dotyczących badania.

Wyrażam zgodę na udział Mojego Dziecka.....w tym badaniu.

Podpis pacjenta.....

Podpis rodzica lub opiekuna prawnego.....

Podpis badacza

Data.....

8. Piśmiennictwo

1. Soerensen M, Soerensen SPL. *The protein in whey. C R Trav Lab Carlsberg* 1939; 23: 55-99
2. Johansson BG. *Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chem Scand* 1960; 14: 510-512
3. Groves ML. *The isolation of a red protein from milk. J Am Chem Soc* 1960; 82: 3345-3350
4. Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S. *Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. (Preparation and properties of lactotransferrin of human milk) Biochim Biophys Acta* 1960; 45: 413-421
5. Baker EN, Baker HM. *Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2531-2539
6. Ward PP, Paz E, Conneely OM. *Multifunctional role of lactoferrin: a critical overview. Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2540-2548
7. Levay PF, Viljoen M. *Lactoferrin: a general review. Haematologica* 1995; 80: 252-267
8. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN. *Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2,8 Å resolution. J Mol Biol* 1989; 209: 711-734
9. Baker EN. *Structure and reactivity of transferrins. Adv Inorg Chem* 1994; 41: 389-463
10. Metz-Boutigue MH, Jollès J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jollès P. *Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur J Biochem* 1984; 145: 659-676
11. Cylwik B, Chrostek L, Szmitkowski M. *Nowe metody oznaczania izoform transferyny w diagnostyce uzależnienia od alkoholu. Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 101-112
12. Masson PL, Heremans JF, Dive C. *An iron-binding protein common to many external secretions. Clin Chim Acta* 1966; 14: 735-739

13. Iyer S, Lönnnerdal B. *Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 232-241
14. Ward PP, Conneely OM. *Lactoferrin: Role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. Biometals* 2004; 17: 203-208
15. Petschow BW, Talbott RD, Batema RP. *Ability of lactoferrin to promote the growth of Bifidobacterium spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. J Med Microbiol* 1999; 48: 541-549
16. Braun V, Braun M. *Active transport of iron and siderophore antibiotics. Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 194-201
17. Valenti P, Antonini G. *Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2576-2587
18. Arnold RR, Cole MF, Mcghee JR. *A bactericidal effect for human lactoferrin. Science* 1977; 197: 263-265
19. Zimecki M, Artym J. *Właściwości terapeutyczne białek i peptydów z siary i mleka. Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 309-323
20. Gadó I, Erdei J, Laszlo VG, Paszti J, Czirok E, Kontrohr T, Tóth I, Forsgren A, Naidu AS. *Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2538-2543
21. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. *Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2588-2598
22. van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV. *Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. Peptides* 2004; 25: 177-183
23. Lu L, Hangoc G, Oliff A, Chen LT, Shen RN, Broxmeyer HE. *Protective influence of lactoferrin on mice infected with Polycytomia-inducing strain of Friend virus complex. Cancer Res* 1987; 47: 4184-4188
24. Beljaars L, van der Strate BW, Bakker HI, Reker-Smit C, van Loenen-Weemaes AM, Wiegmans FC, Harmsen MC, Molema G, Meijer DK. *Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. Antiviral Res* 2004; 63: 197-208

25. Seganti L, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Tinari A, Superti F. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals* 2004; 17: 295-299
26. Jenssen H. Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin - an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 3002-3013
27. Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti p, Belardelli F, Seganti L. Antiviral effect of bovine lactoferin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1055-1062
28. Berkhout B, van Wamel JL, Beljaars L, Meijer DK, Visser S, Floris R. Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res* 2002; 55: 341-355
29. Zuccotti GV, Salvini F, Riva E, Agostoni C. Oral lactoferrin in HIV-1 vertically infected children: an observational follow-up of plasma viral load and immune parameters. *J Int Med Res.* 2006; 34: 88-94
30. Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Kato N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 549-553
31. Hara K, Ikeda M, Saito S, Matsumoto S, Numata K, Kato N et al. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepato Res* 2002; 24: 228- 236
32. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals* 2004; 17: 189- 196
33. Conneely OM. Antiinflammatory Activities of Lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 389S-395S
34. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2549-2559
35. Dial EJ, Lichtenberger LM. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 113-117
36. Kruzel ML, Harari Y, Chen CY, Castro GA. Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation* 2000; 24: 33-44

37. Sacharczuk M, Zagulski T, Sadowski B, Barcikowska M, Pluta R. *Laktoferyna w ósrodkowym ukladzie nerwowym. Neurol Neurochirur Pol* 2005; 39: 482-489
38. Sugi K, Saitoh O, Hirata I, Katsu K. *Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. Am J Gastroenterol* 1996; 91: 927-934
39. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H. *Oral administration of lactoferrin reduses colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1291-1298
40. Dial EJ, Dohrman AJ, Romero JJ, Lichtenberger LM. *Recombinant human lactoferrin prevents NSAID induced intestinal bleeding in rodents. J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 93-99
41. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P. *Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. Cancer Res* 1994; 54: 2310-2312
42. Hayes TG, Falchook GF, Varadhachary GR, Smith DP, Davis LD, Dhingra HM, Hayes BP, Varadhachary A. *Phase I trial of oral talactoferrin alfa In refractory solid tumors. Invest New Drugs* 2006; 24: 233-240
43. Artym J. *Aktywność przeciwnowotworowa i chemioprewencyjna laktoferryiny. Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 352-369
44. Artym J, Zimecki M. *Rola laktoferryiny w prawidłowym rozwoju noworodka. Postepy Hig Med. Dosw.* 2005; 59: 421-432
45. Miller JR, Barrett LJ, Guerrant RL. *A Rapid Test for Infectious and Inflammatory Enteritis. Arch Intern Med* 1994; 154: 2660-2664
46. Silletti RP, Lee G, Ailey E. *Role of Stool Screening Tests In Diagnosis of Inflammatory Bacterial Enteritis and In Selecion of Specimens Likely To Yield Invasive Enteric Pathogens. J Clin Microbiol* 1996; 1161-1165
47. Choi SW, Park CH, Silva TMJ, Zaenker EI, Guerrant RL. *To Culture or Not To Culture: Fecal Lactoferrin Screening for Inflammatory Bacterial Diarrhoea. J Clin Microbiol* 1996; 34: 928-932
48. Venketaraman S, Ramakrishna BS, Kang G, Prasanna Rajan D, Mathan VI. *Faecal lactoferrin as a predictor of positive faecal culture In south Indian children with acute diarrhoea. Ann Trop Paediatr* 2003; 23: 9-13

49. Huicho L, Garaycochea V, Uchima N, Zerpa R, Guerrant R. *Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 644-647
50. Oberhelman RA, Guerrero SE, Boris M, Fernandez ML, Mera R. *Observations on The Impact of Breast – Feeding and of Intestinal Helminthiasis On a Rapid Agglutination Assai For Cefal Lactoferrin In nicaraguan Children With Diarrhea. Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18: 944-946
51. 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; 98: 1310-1314
52. Buderus S, Boone J, Lysterly D, Lentze MJ. *Fecal Lactoferrin: A New Parameter to Monitor Infliximab Therapy. Dig Dis Sci* 2004; 49: 1036-1039
53. D’Incà R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, Martines D, Sturniolo GC. *Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 429-437
54. Walker TR, Land ML, Kartashov A, Saslowsky TM, Lysterly DM, Boone JH, Rufo PA. *Fecal Lactoferrin Is a Sensitive and Specific Marker of Disease Activity in Children and Young Adults With Inflammatory Bowel Disease. J Ped Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 414-422
55. Fine KD, Ogunji F, George J, Niehaus MD, Guerrant RL. *Utility of a rapid fecal latex agglutination test detecting the neutrophil protein, lactoferrin, for diagnosing inflammatory causes of chronic diarrhea. Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1300-1305
56. Silberer H, Kuppers B, Mickisch O, Baniewicz W, Drescher M, Traber L, Kempf A, Schmidt – Gayk H. *Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. Clin Lab* 2005; 51: 117-126
57. Parsi MA, Shen B, Achkar J-P, Remzi FF, Goldblum JR, Boone J, Lin D, Connor JT, Fazio VW, Lashner BA. *Fecal Lactoferrin for Diagnosis of Symptomatic Patients With Ileal Pouch-Anal Anastomosis. Gastroenterology* 2004; 126: 1280-1286
58. Hirata I, Hoshimoto M, Saito O, Kayazawa M, Nishikawa T, Murano M, Toshina K, Wang F-Y, Matsuse R. *Usefulness of fecal lactoferrin and hemoglobin in diagnosis of colorectal diseases. World J Gastroenterol* 2007; 13: 1569-1574

59. Saitoh O, Kojima K, Kayazawa M, Sugi K, Tanaka S, Nakagawa K, Teranishi T, Matsuse R, Uchida K, Morikawa H, Hirata I, Katsu K-I. Comparison of Tests for Fecal Lactoferrin and Fecal Occult Blood for Colorectal Diseases: A Prospective Pilot Study. *Intern Med* 2000; 39: 778-782
60. Larsen A, Hovdenak N, Karlsdottir A, Wentzel-Larsen T, Dahl O, Fagerhol MK. Faecal calprotectin and lactoferrin as markers of acute radiation proctitis: a pilot study of eight stool markers. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1113-1118
61. Arao S, Matsuura S, Nonomura M, Miki K, Kabasawa K, Nakanishi H. Measurement of Urinary Lactoferrin as a Marker of Urinary Tract Infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 553-557
62. Di Mario F, Aragona G, Dal Bó, Cavallaro L, Marcon V, Olivieri P, Benedetti E, Orzès N, Marin R, Tafner G, Chilovi F, de Bastiani R, Fedrizzi F, Franceschi M, Dalvat MH, Monica F, Piazzzi L, Valiante F, Vecchiati U, Cavestro GM, Comparato G, Iori V, Maino M, Leandro G, Pilotto A, Rugge M, Franzè A. Bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: an open, randomized, multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 ; 23: 1235-1240
63. Okuda M, Nakazawa T, Yamauchi K, Miyashiro E, Koizumi R, Booka M, Teraguchi S, Tamura Y, Yoshikawa N, Adachi Y, Imoto I. Bovine lactoferrin is effective to suppress *Helicobacter pylori* colonization in the human stomach: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Chemother* 2005; 11: 265-269
64. Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, Ongkasuwan J, Zhang X, Taylor RJ, Strome SE, O'Malley BW. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1601-1610
65. Ravikumara M, Sandhu BK. Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in Childhood. *Indian J Pediatr* 2006; 73: 717-721
66. Whelan G. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1990;74:1-12
67. Hilbrand H, Finkel Y, Grahnquist L et al. Changing pattern of pediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut* 2003; 52: 1432-1434

68. Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RFA et al. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. *Lancet* 2001; 357: 1093-1094
69. van der Zaag-Loonen HJ, Casparie M, Taminiau JAJM, Escher JC, Rodrigues Pereira R, Derkx HHF. The Incidence of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in the Netherlands: 1999 – 2001. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 302-307
70. Langholz E, Munkholm P, Krasilnikoff PA, Binder V. Inflammatory bowel diseases with onset in childhood. Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 139-147
71. Lakatos L, Lakatos PL. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? *Postgrad Med J* 2006; 82: 332-337
72. Pozler O, Maly J, Bonova O, Dedek P, Frühauf P, Havlickova A, Janatova T, Jimramovsky F, Klimova L, Klusacek D, Kocourkova D, Kolek A, Kotalova R, Marx D, Nevoral J, Petro R, Petru O, Plasilova I, Seidl Z, Sekyrova I, Semendak N, Schreierova I, Stanek J, Sykora J, Sulakova A, Toukalkova L, Travnickova R, Volf V, Zahradnicek L, Zenisková I. Incidence of Crohn Disease in the Czech Republic in the Years 1990 – 2001 and Assessment of Pediatric Population with Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 186-189
73. Karolewska-Bochenek K, Lazowska I, Szamotulska K, Grzybowska K, Ryżko J, Iwańczak F, Czerwionka-Szaflarska M, Kaczmarski M, Ignyś I, Albrecht P, Dziechciarz P. Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland; a 2-year prospective study's preliminary findings. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39, suppl 1: S308
74. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-920
75. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking – a review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 144-149
76. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
77. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491
78. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-4812

79. Roberstson DJ, Sandler RS. Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 51-57
80. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B et al. NOD2/CARD 15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 55-62
81. Miele E, Pascarella F, Quaglietta L, Giannetti E, Greco L, Troncone R, Staiano A. Altered intestinal permeability is predictive of early relapse in children with steroid-responsive ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 933-939
82. Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, Giofré MR, Maggio A, Mattaliano A, Macaluso A, Cottone M. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol* 2005;100: 2730-2736.
83. Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004; 116: 14-18
84. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 341: 1437-1439
85. Rampton DS, Shanahan F. Nieswoiste zapalenia jelit. *Via Medica Gdańsk* 2002
86. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006; 55: 426-431
87. Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2006; 91: 426-432
88. Kubicka K, Kawalec W. *Pediatrics. PZWL, 1999*
89. 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; 103: 162-169
90. Moczko J, Bręborowicz GH, Tadeusiewicz R. *Statystyka w badaniach medycznych. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998*
91. Altman GG. *Practical statistics for medical research. Chapman and Hall, USA, 1991.*

92. Ocena artykułów na temat testów diagnostycznych. *Medycyna Praktyczna. Wydanie Specjalne 1999(1): 63-70*
93. Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P, Cribblez DH, Seibold F. *Accuracy of Four Fecal Assays in the Diagnosis of Colitis. Dis Colon Rectum 2007; 50: 1697-1706*
94. Sipponen T, Savilahti E, Kolho K – L, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. *Crohn's Disease Activity Assessed by Fecal Calprotectin and Lactoferrin: Correlation with Crohn's Disease Activity Index and Endoscopic Findings. Inflamm Bowel Dis 2008; 14: 40-46*
95. Mamula P, Markowitz JE, Baldassano RN. *Pediatric Inflammatory Bowel Disease. Springer 2007; 241-258*
96. Guerrant RL, Araujo V, Soares E, Kotloff K, Lima AAM, Cooper WH, Lee AG. *Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. J Clin Microbiol 1992; 30: 1238-1242*
97. Boone JH, Hahn PE, Lyerly DM. *Measurement of fecal Lactoferrin in Patients Suffering from Clostridium difficile disease. Poster Presentation from the 100. annual meeting of the American Society for Microbiology, Los Angeles*
98. Steiner TS, Flores CA, Pizarro T, Guerrant RL. *Fecal Lactoferrin, Interleukin-1 β , and Interleukin-8 Are Elevated in Patients with severe Clostridium difficile colitis. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4: 719-722*
99. Greenberg DE, Jiang ZD, Steffen R, Verenker MP, DuPont HL. *Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative Escherichia coli pathogenicity. J Infect Dis. 2002; 185: 944-949*
100. Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NHH. *Established and Emerging Biological Activity Markers of Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol 2000; 95: 359-367*
101. Sudo I, Igawa M, Tsuchiya K, Miyaoka M, Saito T. *A study to determine fecal lactoferrin in patients with ulcerative colitis. Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi 1993; 90: 824*
102. Dwarakanath AD, Finnie IA, Beesley CM, O'Dowd GM, Nash J, Tsai HH, Parker N, Rhodes JM. *Differential excretion of leukocyte granule components in inflammatory bowel disease: implications for pathogenesis. Clin Sci (Lond) 1997; 92: 307-313*

- 103.** Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P, Seibold-Schmid B, Seibold F. Discriminating IBD from IBS: Comparison of the Test Performance of Fecal Markers, Blood Leukocytes, CRP, and IBD Antibodies. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 32-39
- 104.** Schröder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1035-1042
- 105.** Dai J, Liu WZ, Zhao YP, Hu YB, Ge ZZ. Relationship between fecal lactoferrin and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; Jun 21: 1-5
- 106.** Saverymuttu SH, Camilleri M, Rees H, Lavender JP, Hodgson HJ, Chadwick VS. Indium 111-granulocyte scanning in the assessment of disease extent and disease activity in inflammatory bowel disease: A comparison with colonoscopy, histology, and fecal indium 111-granulocyte excretion. *Gastroenterology* 1986; 90: 1121-1128
- 107.** 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; 60: 505-512
- 108.** Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn disease activity index. National Cooperative Crohn disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-444
- 109.** 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 disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 439-447
- 110.** Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
- 111.** Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 8167: 514
- 112.** Lim M, Gonsalves S, Thekkinkattil D, Seedat S, Finan P, Sagar P, Burke D. The Assessment of a Rapid Noninvasive Immunochromatographic Assay Test

- for Fecal Lactoferrin in Patients with Suspected Inflammation of the Ileal Pouch. Dis Colon Rectum 2008; 51: 96-99*
- 113.** *van der Sluys Veer A, Biemond I, Verspaget HW, Lamers CBHW. Faecal Parameters in the Assessment of Activity in Inflammatory Bowel Disease. Scand J Gastroenterol 1999; suppl 230: 106-110*
- 114.** *Lundberg JO, Heellström PM, Fagerhol MK, Weitzberg E, Roseth AG. Technology Insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2: 96-102*
- 115.** *Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 1-5*
- 116.** *Bousvaros A, Morley-Fletcher A, Pensabene L, Cucchiara S. Research and clinical challenges in paediatric inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis 2008; 40: 32-38*
- 117.** *Scarpa M, D’Inca R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, Bertin E, Luise A, Frego M, Plebani M, Sturniolo GC, D’Amico DF, Angriman I. Fecal Lactoferrin and Calprotectin After Ileocolonic resection for Crohn’s Disease. Dis Colon Rectum 2007; 50: 861-869*
- 118.** *Instrukcja użycia IBD-SCAN, TechLab Blacksburg, VA 24060*
- 119.** *Boone J. Fecal Lactoferrin Stability. Rufo MPA, Boston 2004*
- 120.** *Kayazawa M, Saitoh O, Kojima K, Nakagawa K, Tanaka S, Tabaka K, Matsuse R, Uchida K, Hoshimoto M, Hirata I, Katsu K. Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. Am J Gastroenterol 2002; 97: 360-369*
- 121.** *Buderus S, Lohmann N, Lentze MJ, Boone J, Lyerly D. Clinical evaluation of the IBD-CHEK™ Test for Detecting Elevated fecal Lactoferrin as Indicator of Intestinal Inflammation in Pediatric Patients. Digestive Disease Week, May 2003, Orlando Florida*
- 122.** *Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. Inflamm Bowel Dis. 2008; 14: 359-366*
- 123.** *Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J, Foell D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing*

inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. Gut 2007; 56: 1706-1713

124. *de Jong NS, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 566-572*

125. *Chung-Faye G, Hayee B'H, Maestranzi S, Donaldson N, Forgacs I, Sherwood R. Fecal M2-Pyruvate Kinase (M2-PK): A Novel Marker of Intestinal Inflammation. Inflamm Bowel Dis 2007; 13: 1374-1378*

126. *Czub E, Herzig K-H, Szaflarska-Popławska A, Kiehne K, Socha P, Woś H, Kamińska B, Błaszczyński M, Cichy W, Bala G, Brodzicki J, Grzybowska-Chlebowczyk U, Walkowiak J. Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2007; 42: 1147-1150*

9. STRESZCZENIE

Laktoferyna jest glikoproteina o masie cząsteczkowej około 80 kDa, która jest wytwarzana, magazynowana i wydzielana do krwi przez granulocyty obojętnochłonne. Białko to bierze udział w wielu reakcjach obronnych organizmu.

Nieswoiste zapalenia jelit należą do grupy przewlekłych chorób zapalnych. Do „złotego standardu” w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit zaliczane jest badanie kolonoskopowe z oceną mikroskopową biopsji błony śluzowej jelita. Obecnie trwają badania nad wykryciem białka wydalanego do światła jelita, którego stężenie odzwierciedlałoby nasilenie procesu zapalnego w jelicie.

Celem pracy była ocena przydatności klinicznej oznaczania laktoferyny w kale w diagnostyce i monitorowaniu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. Dodatkowo jako cel postawiono próbę ustalenia normy referencyjnej tego oznaczenia.

Badaniami objęto 101 dzieci, które były diagnozowane i leczone w klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci AMG. Wśród nich było 60 dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit i 41 dzieci zaliczonych do grupy porównawczej. Łącznie przeanalizowano 123 próbki kału pobrane od dzieci chorych i 41 próbek pobranych od dzieci z grupy porównawczej.

Oznaczenia wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu testu komercyjnego IBD-SCAN. Ponadto u każdego dziecka przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz przeanalizowano wyniki badań dodatkowych.

Stężenie laktoferyny w kale w grupie chorych mieściło się w zakresie od 0,01 do 2080,00 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $335,25 \pm 462,15$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 120,76 $\mu\text{g/g}$ stolca) i było wyższe ($p < 0,001$) od stężenia u dzieci z grupy porównawczej, u których wartości wahały się od 0,26 do 18,80 $\mu\text{g/g}$ stolca (średnia $3,65 \pm 4,71$ $\mu\text{g/g}$ stolca, mediana 1,43 $\mu\text{g/g}$ stolca). Ponadto stężenie laktoferyny w kale korelowało ze stopniem aktywności klinicznej choroby oraz ze stopniem zaawansowania zmian endoskopowych błony śluzowej jelita. Natomiast nie stwierdzono zależności między stężeniem laktoferyny w kale a wiekiem badanego ani lokalizacją zmian zapalnych w jelicie. Oznaczenie stężenia laktoferyny w kale nie pozwala na różnicowanie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

W niniejszej pracy określono wartości referencyjne stężenia laktoferyny w kale, wynoszące poniżej 13 $\mu\text{g/g}$ stolca, niezależnie od wieku i płci.

Wydaje się, że oznaczanie stężenia laktoferyny w kale może być użytecznym parametrem, w diagnostyce i monitorowaniu NZJ.