

Katarzyna Plata- Nazar

**Ocena przydatności klinicznej
oznaczania stężenia neopteryny
w patologii wieku rozwojowego**

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

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej AMG
Gdańsk 2006

SPIS TREŚCI:

1. WSTĘP.....	4
1.1. Wprowadzenie.....	4
1.2. Neopteryna.....	4
1.2.1. Neopteryna i związki pterydynowe.....	4
1.2.2. Wydzielanie neopteryny.....	6
1.2.3. Właściwości biochemiczne neopteryny.....	8
1.2.4. Rola neopteryny.....	9
1.2.5. Normy stężenia neopteryny w populacji ludzi zdrowych.....	11
1.2.6. Kliniczne zastosowanie oznaczania stężenia neopteryny.....	13
1.3. Udział odpowiedzi immunologicznej organizmu w infekcjach (bakteryjnych i wirusowych).....	23
1.4. Udział odpowiedzi immunologicznej organizmu w chorobach o podłożu autoimmunologicznym (nieswoiste zapalenia jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów).....	24
2. CEL PRACY.....	27
3. MATERIAŁ I METODA	28
3.1. Pacjenci.....	28
3.2. Oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy krwi.....	30
3.3. Oznaczanie stężenia prokalcytoniny w surowicy krwi.....	32
3.4. Metody statystyczne.....	34
4. WYNIKI.....	35
4.1. Ustalenie wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci zdrowych (Grupa 1), z uwzględnieniem płci i wieku.....	37
4.2. Stężenie neopteryny w surowicy w poszczególnych grupach dzieci chorych....	43
4.3. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z biegunką (Grupa 2).....	45
4.4. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z zakażeniami układu moczowego (Grupa 3).....	51
4.5. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit (Grupa 4).....	52

4.6. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (Grupa 5).....	60
4.7. Ocena korelacji stężenia neopteryny z innymi parametrami stanu zapalnego (białko C-reaktywne, prokalcytonina) w grupie dzieci chorych.....	64
5. DYSKUSJA.....	66
6. WNIOSKI.....	87
7. ANEKS.....	88
8. STRESZCZENIE.....	114
9. PIŚMIENNICTWO.....	116

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Ocena klinicznej przydatności oznaczania wskaźników aktywności układu immunologicznego wciąż stanowi aktualne zagadnienie dla wielu badaczy, zajmujących się różnymi dziedzinami nauki, zarówno teoretycznymi, jak i praktycznymi. Jednym z wielu takich markerów jest neopteryna. Podwyższone stężenie neopteryny obserwujemy w schorzeniach, w których pobudzona zostaje odporność immunologiczna typu komórkowego. Monitorowanie zmian, jakie zachodzą w czasie choroby w układzie immunologicznym za pomocą szybkiej i czulej metody pomaga wyjaśnić patogenezę schorzenia oraz daje możliwość wdrożenia odpowiedniego leczenia.

Oznaczanie stężenia neopteryny znalazło zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, jednak w piśmiennictwie światowym istnieje niewiele doniesień na temat przydatności klinicznej tego parametru w patologii wieku rozwojowego, a w piśmiennictwie polskim nie znaleziono ani jednego doniesienia na ten temat. W ostatnim czasie (2005 r.) ukazały się prace, gdzie porównywana jest przydatność oznaczania różnych nieswoistych wskaźników m.in. neopteryny, białka C-reaktywnego, prokalcytoniny i udowodniona została celowość ich niezależnego badania (1,2). W niniejszej pracy została podjęta próba oceny przydatności klinicznej badania stężenia neopteryny jako parametru różnicującego oraz monitorującego w chorobach wieku rozwojowego, a także porównania jej wiarygodności względem innych wykładników procesu zapalnego.

1.2. Neopteryna

1.2.1. Neopteryna i związki pterydynowe

Ponad sto lat temu, w roku 1889, ze skrzydeł motyla lepidoptera został wyizolowany przez *Hopkinsa* żółty barwnik (3). Dopiero blisko pięćdziesiąt lat później został on nazwany *pteridine* (*pteron* = skrzydło). Dalsze badania nad barwnikami świata owadów wykazały, że posiadają one podwójny pierścień azotowy.

W roku 1963 z larw pszczoł wyizolowano nowy związek, który nazwano neopteryną (4). Umieszczenie w nazwie *neo-* podkreślało ważność odkrycia i pojawienie się nowego zagadnienia w badaniach nad związkami pterydynowymi.

Obecnie wiadomo, że barwniki pterydynowe występują nie tylko u owadów, ale także płazów, gadów i ryb. U przedstawicieli pozostałych gatunków, np. ssaków, obserwuje

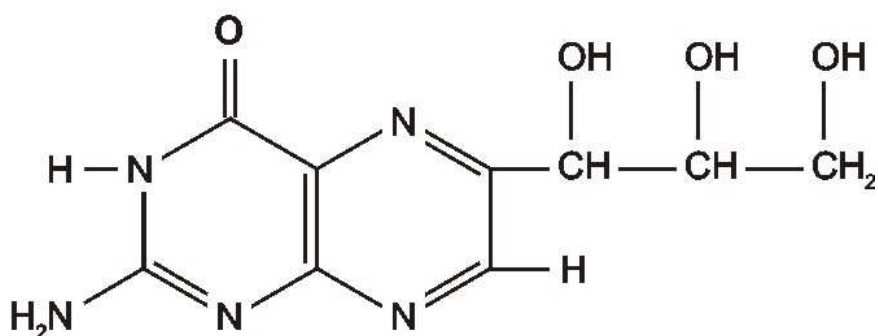
się je w stosunkowo niewielkich ilościach, stąd odkrycie tego faktu wymagało szeregu lat badań. W kolejnych doniesieniach opisywano odkrywane w moczu ludzkim pterydyny, w roku 1956 zidentyfikowano biopterynę, a w 1967 neopterynę (5). Wstępnie uważano neopterynę za produkt uboczny powstający w czasie syntezy biopteryny.

W roku 1971 *Wachter* i wsp. zauważyli, że w moczu pacjentów, u których rozpoznano nowotwór złośliwy, występuje duża ilość składników fluoryzujących (6). W 1979 roku ten sam zespół zidentyfikował owe składniki jako neopteryna, dodatkowo stwierdzając, że są one obecne również w moczu osób z infekcjami wirusowymi (7). Na początku lat osiemdziesiątych opisano neopterynę jako biochemiczny wskaźnik odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (8), a następnie udowodniono, że aktywowane limfocyty T wydzielają IFN- γ , pobudzający monocyty/makrofagi do uwalniania neopteryny (9).

Nepteryna (NPT) należy do grupy **związków pterydynowych**. Według klasyfikacji międzynarodowej (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) związki te zawierają podwójny pierścień azotowy pirazyno-(2,3-d)-pirymidynowy.

Według powyższej klasyfikacji pochodne pterydynowe, które posiadają podstawniki 2-amino-4-oxo-3,4-dihydro należą do **pteryn**.

Neopteryna zawiera trójwęglowy łańcuch boczny przy węglu 6 (Rycina 1).

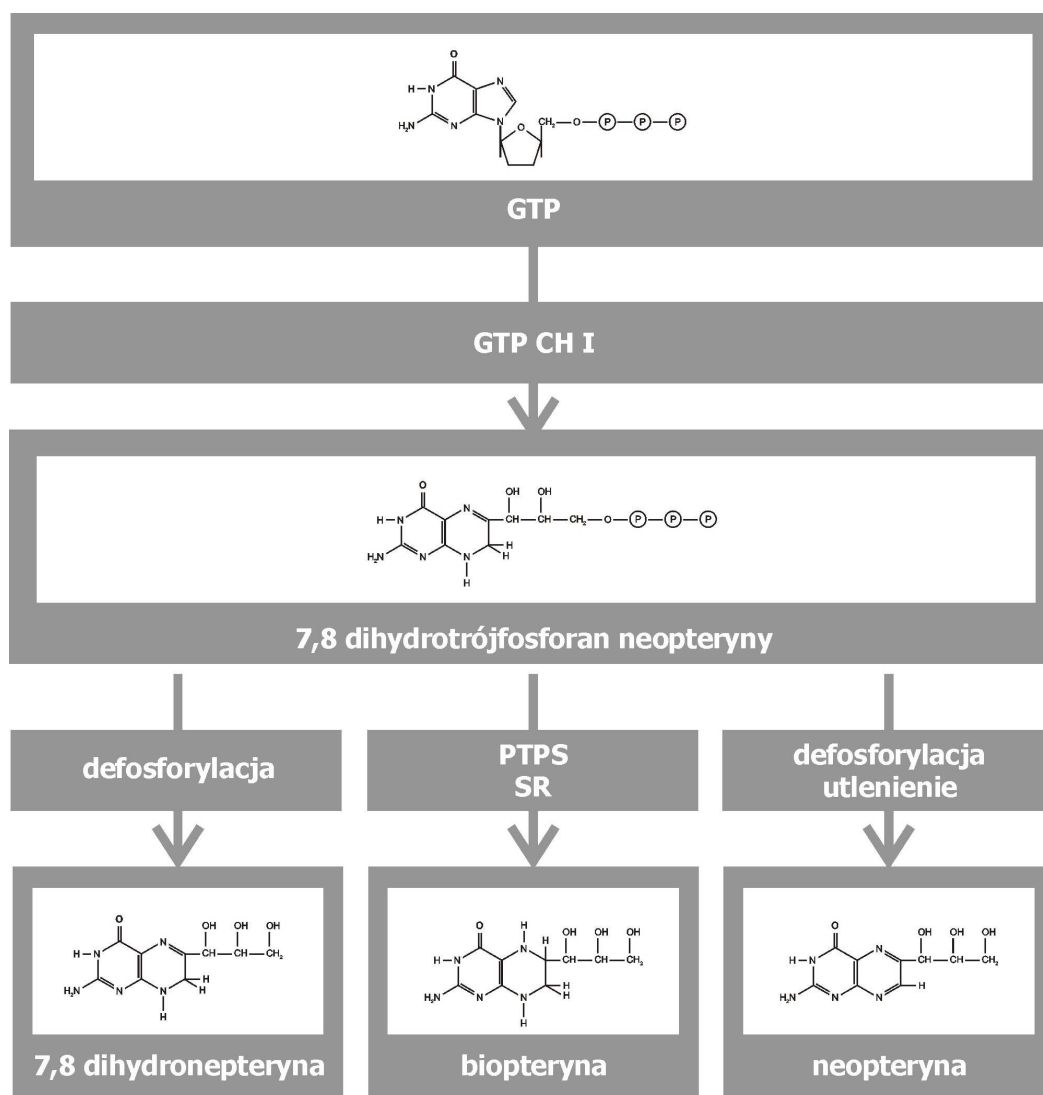


Rycina 1

Neopteryna, (6-D-erythro-trihydroxypropyl)pteryna

1.2.2. Wydzielanie neopteryny

W organizmie ludzkim neopteryna oraz jej pochodne syntetyzowane są z **guanozynotrojfosforanu (GTP)**. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym **GTP-cyklohydralazę-I (GTP-CH-I)** (E.C.3.5.4.16). W jej wyniku powstaje **7,8-dihydrotrójfosforan neopteryny (7,8-NH₂ TP)**. Następnie w efekcie działania kolejnych dwóch enzymów: syntetazy 6-pirogronianowej tetrahydropterynowej (*6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase*, PTPS) (E.C.4.6.1.10) i reduktazy sepiapteryny (*sepiapterin reductase*, SR) (E.C.1.1.1.153) przekształcony zostaje on w **5,6,7,8-tetrahydrobiopterynę (BH₄)** (10,11) (Rycina 2).



Rycina 2

Synteza neopteryny (Wg Fuchs D.: *Neopterin. A message from the Immune System*. BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, 1998; w interpretacji własnej)

Biopteryna (BH4) pełni funkcje kofaktora w reakcji hydroksylacji fenyloalaniny do tyrozyny, jaka zachodzi w wątrobie, a także tyrozyny do L-dopa i tryptofanu do 5-hydroksytryptofanu w tkankach neuroendokrynych. Stąd względnie duże ilości biopteryny produkowane są w wymienionych tkankach oraz w limfocytach (12).

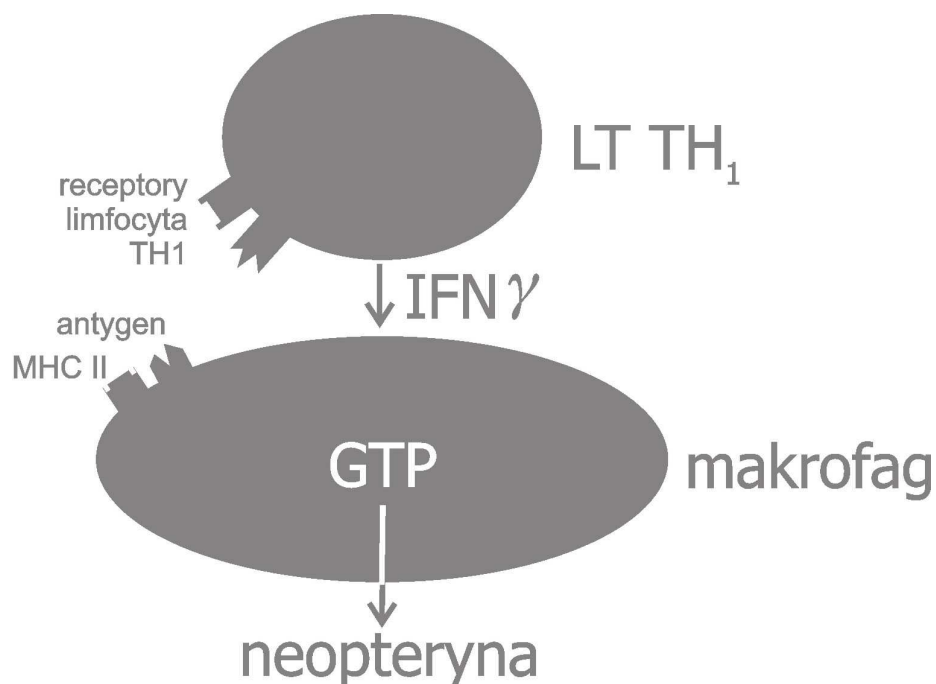
Taki przebieg mają reakcje zachodzące w większości komórek, takich jak fibroblasty lub komórki śródbłonna. Inaczej dzieje się w ludzkich monocytach/makrofagach, gdzie aktywność enzymów PTPS i SR jest bardzo niewielka (11,12). Skutkiem tego nagromadzony 7,8-dihydrotrojfosforan neopteryny (7,8-NH₂ TP) podlega dalszemu metabolizmowi i zostaje wydzielony na zewnątrz komórki jako (w efekcie defosforylacji) **7,8-dihydroneopteryna** lub (w efekcie defosforylacji i utlenienia) **neopteryna** (11,13,14) (Rycina 2).

Obecnie wiadomo, że czynnikiem pobudzającym wydzielanie NPT przez ludzkie monocyty/makrofagi jest IFN- γ . Działa on poprzez pobudzenie aktywności enzymu GTP-CH-I (11).

Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że do syntezy neopteryny może dochodzić również poprzez stymulację za pośrednictwem interferonu- α (IFN- α), jednak IFN- α potrzeba tysiąc razy więcej, aby otrzymać taki efekt, jak przy pobudzeniu IFN- γ (9).

Zaobserwowano, że interleukina 2 (IL-2) może dodatkowo zwiększać produkcję NPT (15). Podobnie podaż czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (GM-CSF) nasila produkcję neopteryny w organizmie, prawdopodobnie poprzez wzrost liczby monocytów/makrofagów (16).

W organizmie ludzkim, w czasie choroby (np. infekcji HIV) obserwuje się wzrost stężenia neopteryny. Udowodniono również, że w czasie stymulacji układu immunologicznego przez IFN- γ , za produkcję neopteryny odpowiedzialne są tylko monocyty/makrofagi, a nie komórki nabłonka. Ostatecznie uznano, że w organizmie ludzkim neopteryna pochodzi z jednego źródła. W sytuacji, kiedy w organizmie ludzkim uruchomiona zostaje odpowiedź immunologiczna typu komórkowego, pobudzone limfocyty Th1 uwalniają IFN- γ , który wyzwała neopterynę z monocytów/makrofagów (11) (Rycina 3).



Rycina 3

Odpowiedź immunologiczna typu komórkowego- wydzielanie neopteryny (Wg Fuchs D.: *Neopterin. A message from the Immune System*. BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, 1998; w interpretacji własnej)

Zwykle u człowieka występuje ścisła korelacja pomiędzy stężeniem NPT a IFN- γ (17,18). Badania wykazały, że od tej reguły odbiegają pacjenci leczeni wysokimi dawkami IFN- α , np. z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. U tych chorych występuje wzrost stężenia neopteryny, bez wzrostu stężenia IFN- γ . Po zakończeniu leczenia korelacje między NPT a IFN- γ pojawiają się ponownie (19).

1.2.3. Właściwości chemiczne neopteryny

Neopteryna jest molekułą o niskiej masie molekularnej 253 D. Jest to związek aromatyczny, silnie fluoryzujący (w przeciwieństwie do jej pochodnych: 7,8-dihydronepteryny czy biopteryny). Może występować pod postacią różnych stereizomerów. Zdecydowanie najczęściej spotykanym w materiale biologicznym jest

6-D-erythro-neopteryna, natomiast 6-D-threo-neopteryna występuje tylko w śladowych ilościach. Jest ona wrażliwa na światło słoneczne, pod wpływem którego ulega rozkładowi. Neopteryna w postaci niezmienionej wydalana jest drogą nerek.

1.2.4. Rola neopteryny

Rola neopteryny oraz jej pochodnych, ich biologiczne funkcje, nie zostały dotychczas do końca poznane i wyjaśnione.

Doniesienia ostatnich lat ukazują wstępne dowody na to, że istnieje zależność między produkcją neopteryny i jej pochodnych, a zdolnościami cytotoksycznymi makrofagów. Komórki żerne, do których zaliczamy makrofagi, zabijają wewnątrzkomórkowo drobnoustroje za pośrednictwem mechanizmów tlenowych i beztlenowych. Wydzielanie neopteryny jest ściśle związane ze zdolnością monocytów/makrofagów do uwalniania reaktywnych form tlenu (RFT) (11,20,21,22).

Reaktywne formy tlenu stanowią naturalną linię obrony organizmu ludzkiego w walce z patogenem, uczestnicząc w „tlenozależnym systemie zabijania wewnątrzkomórkowego”. Działanie RFT może prowadzić do niszczenia patogenów, jednak wytwarzanie ich w nadmiernej ilości może prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek gospodarza. Osłabiona zostaje tzw. bariera antyoksydacyjna, która naturalnie ogranicza działanie RFT, a do której należą: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, a także inne związki o charakterze antyoksydacyjnym. Powstaje zjawisko zwane „stresem oksydacyjnym” (23).

U zdrowego człowieka istnieje naturalnie uwarunkowana równowaga między ilością reaktywnych form tlenu a ilością antyoksydantów.

Wzrost wydzielania neopteryny wiąże się ze wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu i niskim stężeniem antyoksydantów w surowicy krwi. Dlatego produkcja neopteryny może być także interpretowana jako **pośrednia miara wielkości immunologicznie indukowanego stresu oksydacyjnego** (11,24).

Badania wykazały, że przy braku żelaza, neopteryna staje się potencjalnym zmiataczem reaktywnych form tlenu (25). Hamuje ona także aktywność oksydazy ksantynowej (26) oraz NADPH oksydazy (27). Wymienione enzymy katalizują procesy metaboliczne będące istotnym źródłem RFT (23,28).

Neopteryna może więc pobudzać lub hamować reakcje wolnorodnikowe, ewentualnie pozostawać wobec nich bez wpływu (29). Działanie jej może polegać m.in. na pobudzaniu uwalniania RFT przez komórki bądź hamowaniu aktywności wybranych enzymów (30,31).

Zredukowane pochodne neopteryny: 7,8-dihydroneopteryna i 5,6,7,8-tetrahydropteryna uznane zostały antyoksydantami i opisywane są powszechnie jako zmiatacze RFT (29).

Reasumując, neopteryna i jej pochodne, mogą zarówno pobudzać, jak i hamować zdolności cytotoksyczne komórki, w zależności od stanu utlenienia i pH środowiska, a to może stanowić o ostatecznym efekcie aktywności makrofagów (21,30).

Neopteryna oraz jej pochodne opisywane są zarówno jako pro- jak i antyoksydanty, zależnie od warunków chemicznych, biochemicznych i biologicznych wykonywanych badań, a ich fizjologiczna rola nadal nie jest do końca poznana (31,32).

Wyniki badań sugerują fizjologiczną rolę neopteryny i jej pochodnych, jako endogenego regulatora efektu cytotoksycznego aktywowanych makrofagów, poprzez wpływ na reaktywne formy tlenu (20,21). Dlatego, można nawet zakładać, że zdolności cytotoksyczne makrofagów mogą być wyrównywane przez dodatkową produkcję neopteryny (20).

Tak więc, makrofagi, poprzez wzbudzanie reaktywnych form tlenu i produkcję neopteryny, modulują zdolności cytotoksyczne komórki.

W badaniach wykonanych również *in vitro* wykazano, że pochodne neopteryny pobudzają translokację i transkrypcję NF-kB (*nuclear factor kappa B*, czynnik transkrypcyjny kappa B), który bierze udział m.in. w **kontroli apoptozy** (33). Wysokie stężenia 7,8-dihydroneopteryny nasilały za pośrednictwem indukcji TNF-alfa programowaną śmierć komórki (34). Udowodniono także, że neopteryna i 7,8-dihydroneopteryna są **induktorami apoptozy *per se*** (35).

W badaniach *in vitro* wykazano również, że neopteryna hamuje ekspresję genu odpowiedzialnego za produkcję erytropoetyny, a tym samym hamuje produkcję erytropoetyny (36). Obserwacje osób z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego wykazały, że wzrost stężenia neopteryny jest proporcjonalny do

spadku poziomu hemoglobiny. Jest to jedna z hipotez narastania niedokrwistości u onko-hematologicznych pacjentów (17).

Badania wskazują na to, że neopteryna i 7,8-dihidroneopteryna mogą wpływać także na ekspresję onkogenów (37). Może to tłumaczyć związek pochodnych neopteryny z obecnością złośliwego procesu nowotworowego (20).

Dodatkowo badania ostatnich lat ukazują, że neopteryna poprzez wpływ na indukowanie reaktywnych form tlenu, może modulować również rozwój, proliferację i przeżycie komórek nowotworowych (22).

W przyszłości badania będą skierowane na udział neopteryny i jej pochodnych w: modulowaniu odporności immunologicznej poprzez wpływ na wewnątrzkomórkową równowagę między RFT (uszkodzającymi składniki komórki), a antyoksydantami (przeciwdziałającymi tym reakcjom) (38).

1.2.5. Normy stężenia neopteryny w populacji ludzi zdrowych

Normy stężenia neopteryny w populacji ludzi zdrowych różnią się według poszczególnych autorów i źródeł. Rozbieżności dotyczą występowania zmian stężenia NPT zależnie od wieku i płci, co zostanie szczegółowo omówione w rozdziale pt. Dyskusja.

Stężenie neopteryny **w surowicy** krwi wyrażane jest w w nmol/l.

Dane, dotyczące dorosłych i dzieci, które zostały aktualnie zgromadzone pokazują, że w 97,2% przypadków stężenie neopteryny oznaczane w surowicy ludzi zdrowych mieści się poniżej 10 nmol/l. Dlatego powszechnie jako normę stężenia neopteryny w surowicy krwi przyjmuje się stężenia mieszczące się poniżej wartości granicznej (tzw. *cut-off*) wynoszącej 10 nmol/l, przy czym producenci testów zalecają opracowanie przez poszczególne laboratoria własnych zakresów referencyjnych. Należy podkreślić, że w literaturze światowej istnieje niewiele (w polskiej nie znaleziono żadnego) doniesień na temat wartości referencyjnych stężenia NPT w surowicy u dzieci i młodzieży (39,40,41).

Stężenie neopteryny **w moczu** wyrażane jest zwykle jako $\mu\text{mole NPT/mol}$ kreatyniny.

Neopteryna w postaci niezmienionej wydalana jest drogą nerek (drogą filtracji kłębkowej i transportu cewkowego) (42), stąd u pacjentów z upośledzoną funkcją nerek

możemy obserwować wzrost stężenia NPT w surowicy. Badania wykazały, że stosunek NPT/kreatynina w moczu jest zależny od płci i wieku. Zależności względem płci nie uwzględnia w swojej publikacji *Murr* (11) podając wartości referencyjne stężenia neopteryny w moczu dzieci (Tabela 1). Najwyższe wartości stwierdzono u noworodków.

Zaobserwowano, że wraz z wiekiem stosunek NPT/kreatynina w moczu maleje, by najniższe wartości osiągnąć w grupie wiekowej 25-35 lat, a następnie wraz z wiekiem ponownie powoli rośnie. W grupie mężczyzn występują wartości niższe NPT/kreatynina niż u kobiet w tym samym przedziale wieku (20). Według niektórych autorów (43) opisane powyżej zależności stosunku NPT/kreatynina w moczu mogą być związane ze zmieniającym się stężeniem kreatyniny w moczu. Średnio przyjęto, że stężenie neopteryny w moczu zdrowych mężczyzn wynosi 115 ± 36 μmol NPT/1 mol kreatyniny, a u kobiet 140 ± 40 μmol NPT/1 mol kreatyniny.

Tabela 1

Wartości referencyjne stężenia neopteryny w moczu u dzieci (Wg: Murr C., Winder B., Wirleitner B. i wsp.: *Neopterin as a marker for immune system activation. Current Drug Metabolism, 2002, 3, 175-187*)

Wiek dzieci (w latach)	Średnie stężenie NPT w moczu (μmole NPT/mol kreatyniny)
1-3	267 ± 94
3-7	226 ± 76
7-11	181 ± 73
2-14	171 ± 73
5-18	144 ± 65

Jako normę stężenia neopteryny w **płynie mózgowo- rdzeniowym (PMR)** u osób dorosłych przyjęto $4,2 \pm 1,0$ nmol/l (20). W doniesieniu *Millnera* i wsp. z 1998 roku u dzieci, bez cech infekcji CUN, które były w wieku od 4 do 18 lat stężenie neopteryny w PMR nie przekroczyło 9,3 nmol/l (40). Według *Ormazabala* stężenie NPT w płynie mózgowo-rdzeniowym, jakie badał u 127 dzieci, w wieku od 11 dni do 16 lat, nie zależy od wieku (44).

Podjęto również próbę ustalenia norm stężenia neopteryny w **ślinie** (20,45), które wynoszą od 0,2 do 3,4 nmol/l oraz w **płylinie maziowym** od 1 do 9 nmol/l. Badano stężenie neopteryny w **płylinie puchlinowym**, a otrzymane wyniki mieściły się pomiędzy 5,3 a 26,3 nmol/l.

1.2.6. Kliniczne zastosowanie oznaczania stężenia neopteryny

Infekcje

Pierwsze spostrzeżenia dotyczące wzmożonego wydzielania neopteryny w moczu ludzi, u których rozpoznana została infekcja wirusowa, poczynił *Wachter* i wsp. w 1979 roku (7). Od tamtego czasu ukazało się bardzo wiele prac, gdzie neopteryna uznana została za parametr pomocny w różnicowaniu infekcji wirusowych od bakteryjnych (46,47).

Odporność typu komórkowego aktywowana jest w odpowiedzi organizmu na infekcje wirusowe, bakteriami wewnątrzkomórkowymi, pasożytnicze, grzybicze.

U pacjentów z ostrą infekcją wirusową obserwowano skrajnie wysokie stężenia neopteryny, w przeciwieństwie do pacjentów z ostrą infekcją bakteryjną, gdzie stężenia neopteryny znajdują się w zakresie normy, bądź nieznacznie tylko ją przekraczają (20). Podwyższone stężenie NPT może występować również u tych pacjentów, u których doszło do przewlekłej infekcji bakteryjnej (20).

Infekcje wirusowe.

Wzrost stężenia neopteryny, zależny od stopnia zaawansowania choroby, obserwowano u pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby (48), różyczką (49), odra (50), świnką, ospa wietrzna, grypą, w przebiegu cytomegalii (51) i mononukleozy (11,20). W czasie ostrej infekcji wirusowej stężenie neopteryny ulega podwyższeniu jeszcze przed wystąpieniem początkowych objawów klinicznych, osiągając najwyższe wartości przed wzrostem ilości przeciwciał do miana oznaczalnego (52). Po uzyskaniu serokonwersji stężenie neopteryny powraca do normy w czasie kilku dni (20), od dwóch do czterech tygodni od osiągnięcia maksymalnej wartości (11). Nie zaobserwowano istotnych różnic wykreślając krzywe stężenia neopteryny w przebiegu zakażenia wirusem DNA (cytomegalii) i RNA (różyczki) (49,53).

W przebiegu przewlekłej infekcji wirusowej (np. HIV, *Human Immunodeficiency Virus*), po uzyskaniu serokonwersji, wydzielanie neopteryny spada, ale jej poziom nie osiąga normy.

Największa przydatność kliniczną w przebiegu infekcji wirusowych znalazła neopteryna właśnie w zakażeniach wirusem HIV (11,38,54,55). Autorzy donoszą, że już we wczesnym okresie zakażenia wirusem HIV u wszystkich chorych obserwuje się podwyższone stężenia neopteryny. Ocena stężenia neopteryny doskonale nadaje się do monitorowania przebiegu zakażenia, bowiem pacjenci w bezobjawowym okresie choroby mają miernie, przewlekłe podwyższone stężenie NPT, natomiast zdecydowanie najwyższe stężenia obserwuje się u pacjentów z progresją choroby, rozwijających pełnoobjawowe AIDS (56,57,58). Narastanie stężenia NPT jest równoległe ze spadkiem ilości subpopulacji limfocytów CD4+ (58,59), koreluje z *ratio* limfocytów CD4+ : CD8+ (60). Według najnowszych wyników badań potwierdzono, że stężenie neopteryny w surowicy i w moczu u osób zakażonych HIV ściśle koreluje z przebiegiem zakażenia (38). Ocenia się, iż neopteryna posiada w tym przypadku wartość prognostyczną porównywalną z takimi parametrami prognostycznymi jak: liczba limfocytów CD4+, czy badania metodą PCR (*polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) obecności wirusa HIV-1 (61) i może być bardziej czułym wskaźnikiem zakażenia HIV, niż stężenie alfa-2-mikroglobuliny (58).

Najnowsze publikacje podkreślają dużą przydatność kliniczną oznaczania stężenia neopteryny u chorych z zespołem ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*). Choroba ta jest wywoływana przez nowoodkryty wirus. Badano 129 chorych, wszyscy ci pacjenci mieli wysokie stężenie NPT w surowicy (średnio 34,2 nmol/l), korelujące z gorączką i kliniczną progresją choroby. Oceniono, że wstępna ocena stężenia NPT w surowicy u tych chorych pozwala przewidzieć dalszy przebieg zachorowania (62).

Infekcje bakteriami wewnątrzkomórkowymi.

Bakterie wewnątrzkomórkowe uruchamiają w organizmie ludzkim odpowiedź typu komórkowego. Przykładem tych bakterii są: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* i *Brucella* (11,20,63,64,65,66,67).

Prowadzone badania u pacjentów z postacią płucną gruźlicy wykazały, że stężenie neopteryny jest adekwatne do stopnia zaawansowania i aktywności choroby, co dotyczy również dzieci (68,69).

Choroby pasożytnicze.

Prowadzone były także badania oceniające przydatność kliniczną neopteryny w przebiegu chorób pasożytniczych wywołanych przez pierwotniaki (20). Wiadomo, że

nawet przy łagodnie przebiegającym zakażeniu w przypadku malarii (70), stężenie neopteryny ulegało podwyższeniu. Pacjenci, u których neopteryna osiągnęła najwyższe stężenia, chorowali bardzo ciężko. Spośród zakażonych *Plasmodium falciparum*, u 94% pacjentów przebieg choroby i leczenia można było śledzić przy pomocy oceny stężenia NPT w moczu (18). Aby podkreślić miarę przydatności oznaczania NPT, trzeba przypomnieć, że zakażenie *Plasmodium falciparum* stanowi pierwszą przyczynę zgonów dzieci w statystyce międzynarodowej (71).

Nie potwierdzono natomiast przydatności badania stężenia neopteryny w diagnostyce zakażeń pierwotniakiem *Giardia lamblia* (72). U tych chorych stężenia NPT w surowicy, badane metodą RIA, były niskie przed włączeniem leczenia przeciw pasożytniczego, a po eliminacji pierwotniaka obserwowano wzrost stężenia NPT (72). Inni autorzy, którzy również badanie stężenia neopteryny w lambliozie uznali za nieprzydatne, oznaczali stężenie NPT w kale (73).

Infekcje centralnego układu nerwowego.

Neopteryna penetruje przez barierę krew-mózg, dlatego też istnieje zależność między stężeniem neopteryny w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym (74). W sytuacji, kiedy infekcja toczy się wewnątrzoponowo, stężenie NPT oznaczane w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bardziej czułym parametrem niż stężenie NPT oznaczane w surowicy (75,76,77).

U pacjentów z ostrą neuroboreliozą stężenia neopteryny w płynie mózgowo-rdzeniowym osiągały skrajnie wysokie wartości (powyżej 100 nmol/l). Po włączeniu odpowiedniego leczenia obserwowano systematyczne obniżanie się stężenia NPT. U tych samych pacjentów stężenie neopteryny oznaczane w surowicy zarówno przed, jak i po włączeniu leczenia, pozostawało niezmiennie w zakresie prawidłowym (40,78,79).

Przydatność diagnostyczna oznaczania stężenia neopteryny w **Oddziałach Intensywnej Opieki Medycznej** jest wielokrotnie podkreślana i pozytywnie oceniana (20).

Oznaczanie stężenia neopteryny może pozwolić wykryć potencjalną możliwość rozwinięcia septycznych powikłań u pacjentów przebywających w OIOM w okresie pooperacyjnym, czy pourazowym. Pacjenci, u których w późniejszym etapie choroby wystąpiła posocznica, już w okresie ją poprzedzającym, mieli znacząco wyższe stężenie NPT (80).

W 1996 roku *Strohmaier* i wsp. po badaniach prospektywnych przeprowadzonych na dużej grupie (ponad 500) pacjentów OIOM ocenili, że znajomość stężenia neopteryny

w surowicy może stanowić cenną informację przy podejmowaniu decyzji o dalszym leczeniu (81).

Gołębiowska obejmując swoimi badaniami grupę 100 pacjentów OIOM oceniła, iż stężenie neopteryny koreluje z oceną stanu pacjenta, jakiej dokonuje się za pomocą skal ciężkości choroby. Stężenia neopteryny u pacjentów OIOM istotnie różniły się w grupach osób, które przeżyły i które zmarły (z powodu posocznicy lub dysfunkcji wielonarządowej). Według autorki seryjne oznaczanie stężenia neopteryny u chorych przebywających w Oddziałach Intensywnej Opieki pozwala na monitorowanie przebiegu choroby oraz umożliwia przewidywanie wyników leczenia (14).

Trzeba jednak pamiętać, że warunkiem koniecznym do uzyskania prawdziwego wyniku pomiaru stężenia neopteryny w surowicy, jest prawidłowa funkcja nerek. Z tego powodu część pacjentów OIOM, np. chorych z zespołem dysfunkcji wielonarządowej (MODS, *multiorgan dysfunction syndrome*) może nie kwalifikować się do badania stężenia NPT.

Oparzenia.

Monitorowanie stężenia neopteryny u pacjentów, którzy ulegli oparzeniu, pozwala szybko rozpoznać rozwijającą się infekcję. Wyniki badań prowadzonych w kilku ośrodkach, w ostatnich latach wykazały, że stężenia neopteryny w surowicy oraz ilość krążących we krwi endotoksyn były znacząco wyższe u osób oparzonych, adekwatnie do rozmiaru oparzonej powierzchni. Były one również zdecydowanie wyższe u pacjentów, u których rozwinęła się posocznica i którzy nie przeżyli. Jako wnioski przedstawiono tezę, że oparzenia termiczne indukują wydzielanie neopteryny, a endotoksyny obecne w krążeniu mogą być odpowiedzialne za podtrzymywanie tej indukcji (82,83).

Stomatologia.

Oznaczanie stężenia neopteryny w ślinie rozpoczęto wykorzystywać również w stomatologii. Stwierdzono, że lokalnie (w ślinie) podwyższone wartości NPT korelują ze stopniem zaawansowania chorób zapalnych przyzębia. U tych pacjentów nie obserwowano wzrostu stężenia NPT w moczu (45). Wyniki są zachęcające do dalszych dyskusji nad zastosowaniem badania stężenia neopteryny w ślinie w codziennej praktyce stomatologicznej, jako metody całkowicie nieinwazyjnej.

Choroby autoimmunologiczne

Definiując zjawisko autoimmunizacji bierzemy pod uwagę reaktywność komórek, które należą do układu odporności adaptacyjnej (immunokompetentne limfocyty T i B), zwróconej przeciw własnym antygenom ustroju. Udział odporności komórkowej pozwala spodziewać się podwyższonego stężenia NPT w płynach ustrojowych.

Reibnegger i wsp. badając stężenie neopteryny w moczu ponad 100 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) ocenił ten test jako czuły w monitorowaniu klinicznego przebiegu choroby, choć bardzo podkreślił brak swoistości testu. Dodatkowo wykazano w tej pracy przydatność oznaczania stężenia neopteryny jako parametru różnicującego RZS z chorobami kości i stawów o podłożu degeneracyjnym (84). *Maerker-Alzer* i wsp. najwyższe stężenia neopteryny stwierdzili w płynie stawowym, w czasie zaostrzenia choroby (85).

Następne schorzenie o podłożu autoimmunologicznym, w którym badano stężenie neopteryny, to toczeń rumieniowaty (86,87). Podczas wieloczynnikowej analizy tych chorych oceniono stężenie NPT jako jeden z parametrów najbardziej reprezentatywnych dla pobudzenia układu immunologicznego. Korelację stężenia NPT z aktywnością choroby oceniono lepiej niż w przypadku rozpuszczalnego receptora TNF typ 55 kD (sTNF-R), beta-2-mikroglobuliny czy rozpuszczalnego receptora IL-2 (sIL-2-R). Badania prowadzone w 2005 roku na materiale 40 kobiet z toczniem rumieniowatym wykazały, że stężenie neopteryny oraz obecny w ich surowicy rozpuszczalny receptor TNF II (p75), to bardziej czułe markery choroby od TNF-alfa oraz składowych dopełniacza C3 i C4 (88).

Również w zapaleniu wielomięśniowym i skórno-mięśniowym stężenie neopteryny wzrastało zgodnie ze stopniem zaawansowania choroby (89).

Stężenie neopteryny w moczu to także przydatny parametr w monitorowaniu aktywności choroby Leśniowskiego- Crohna (90,91). Obserwacje dotyczące zmian stężenia NPT przyczyniły się do bliższego poznania etiopatogenezy tej choroby i udziału w niej układu immunologicznego.

Podobnie oceniono przydatność oznaczania stężenia NPT w monitorowaniu aktywności procesu chorobowego u osób z rozpoznaniem *colitis ulcerosa* (92).

Choroby nowotworowe

Neopteryna nie jest markerem swoistym, umożliwiającym ustalenie rozpoznania u pacjenta onkologicznego. **Wzrost stężenia NPT jest jedynie informacją o pobudzeniu odporności komórkowej**, do czego dochodzi w bardzo różnych okolicznościach. Mimo to, na podstawie szeroko prowadzonych badań, neopterynę uznano za parametr bardzo przydatny w onkologii. Oceniono, że jej stężenie koreluje ze stopniem zaawansowania procesu nowotworowego, ryzykiem przerzutów, nawrotów i zgonu.

Częstość, z jaką obserwuje się podwyższone stężenie neopteryny w surowicy lub moczu u pacjentów z chorobą nowotworową w momencie ustalenia rozpoznania, zależy między innymi od typu nowotworu i wynosi od 90% w nowotworach układu krwiotwórczego do 20% w takich nowotworach jak guz piersi, czy czerniak złośliwy (11,93,94,95). Wśród chorych z guzem jajnika około 80% chorych ma podwyższone stężenie NPT w czasie postawienia diagnozy, 70% pacjentów z nowotworem trzustki, blisko 60% z guzem płuc, 55% z nowotworem szyjki macicy. Wartość stężenia neopteryny zależy również od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej i uogólniając można stwierdzić, że im wyższe stadium zaawansowania tym wyższe stężenie neopteryny (93). W momencie włączenia leczenia obserwuje się spadek, czasem nawet normalizację, tego parametru. Wykazano nawet zależność między stężeniem NPT w moczu, a przybliżoną całkowitą masą guza.

Najbardziej spektakularnym wydaje się jednak fakt, że badanie stężenia neopteryny okazuje się być znamienym i niezależnym parametrem prognostycznym, dotyczącym przeżycia chorych. Zależność „im wyższe stężenie neopteryny, tym gorsze rokowanie” wykazano u pacjentów z nowotworem: układu krwiotwórczego (96), szyjki macicy (97), jajnika (98), jelita grubego (99), płuc (100,101), prostaty (102), wątroby (103).

Monitorowanie stężenia NPT (zwłaszcza w moczu, jako użycie metody bezinwazyjnej) może być przydatne również po zakończeniu leczenia, kiedy wzrost jej stężenia pozwala podejrzewać nawrót choroby.

Niemniej, trzeba jednak zdecydowanie podkreślić, że w znamienitej większości przypadków uznane markery choroby nowotworowej, które produkowane są poprzez dany guz, lepiej korelują ze wzrostem guza niż stężenie NPT, choć wykazano lepszą rolę neopteryny jako parametru prognozującego przeżycie (11).

Istnieją też zwolennicy teorii, że obserwowana ujemna korelacja między stężeniem neopteryny we krwi, a stężeniem hemoglobiny, jest wtórna do zahamowania syntezy hemoglobiny przez NPT, co tłumaczy występowanie niedokrwistości w nowotworach złośliwych (17,36). Natomiast wytwarzany równocześnie z IFN-gamma przez pobudzone monocyty/makrofagi TNF-alfa (czynnik martwicy nowotworów, *tumor necrosis factor*) może przyczyniać się do narastania wyniszczenia organizmu w chorobie nowotworowej, kiedy dochodzi do przewlekłej stymulacji układu immunologicznego (104).

Transplantologia

Oznaczanie stężenia neopteryny znajduje szerokie zastosowanie w transplantologii. Utrzymujące się na stałym poziomie, bądź wracające do normy, stężenie NPT w surowicy, czy moczu, po zabiegu chirurgicznym związanym z przeszczepem, oznacza przebieg poopreacyjny niepowikłany. Narastające stężenie NPT zapowiada powikłania w postaci odrzucenia przeszczepu lub infekcji (105). Takie doświadczenia opisywane są po przeszczepie nerki (106), gdzie autorzy obliczyli, że systematyczne pomiary stężenia NPT pozwoliły o cztery dni przyspieszyć diagnozę odrzucenia przeszczepu. Podobne dane dotyczą przeszczepu serca (107), a także wątroby (108), trzustki (109), przy czym zauważono, że w tych przypadkach oznaczanie stężenia NPT w żółci czy soku trzustkowym znacznie podnosi czułość tego badania (110).

Badacze zwracają uwagę, że nie oznacza to zaprzestania wykonywania oznaczeń innych parametrów stanu zapalnego, a neopteryna pozostaje wciąż jednym z wielu markerów.

U pacjentów po przeszczepach szpiku seryjne oznaczanie stężenia NPT pozwala przewidzieć chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD, *graft versus host disease*) lub rozwój infekcji wirusowej (111).

Monitorowanie leczenia

Seryjne oznaczenia stężenia neopteryny w czasie leczenia pacjentów chorych na gruźlicę pomagają ocenić efekty terapii przeciwgruźliczej (63,68). Potwierdzono to w publikacji dotyczącej gruźlicy płuc u dzieci, gdzie leczenie monitorowano poprzez oznaczenia stężenia neopteryny w moczu, z bardzo dobrym efektem, wysoko oceniając przydatność kliniczną oznaczania stężenia neopteryny (69).

Również skuteczność terapii antywirusowej u osób zakażonych wirusem HIV można ocenić badając stężenia neopteryny (38). Pierwsze efekty są widoczne już po kilku

dniach od włączenia leczenia (56). Oczekiwany efekt jest spadek stężenia neopteryny w surowicy i innych płynach ustrojowych (112).

Przydatność oznaczania stężenia NPT w ocenie efektu wysoko aktywnej terapii antywirusowej (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART) została także wykazana (113).

Neopteryna znalazła również zastosowanie jako parametr monitorujący leczenie całego szeregu innych infekcji, m.in. malarii (18), boreliozy (40).

Potwierdzono również jej przydatność w monitorowaniu leczenia chorób autoimmunologicznych (86).

Stosując terapię immunomodulującą, np.: interferon, interleukiny czy TNF-alfa, obserwuje się wzrost stężenia NPT proporcjonalny do zastosowanych dawek danego leku. Pozwala to nie tylko na monitorowanie, ale i na optymalizację leczenia (20).

Transuzjologia

Jednym z największych niebezpieczeństw związanych z przetoczeniem krwi jest ryzyko przeniesienia na biorcę chorobotwórczego patogenu. Podejmowano wiele prób wykonywania rozmaitych badań przesiewowych, gdzie do najnowszych stosowanych należy technika PCR. Żadna nie daje jednak całkowitej pewności, a dodatkowo należy pamiętać jeszcze o „okienku diagnostycznym”, kiedy dawca jest zakażony patogenem, ale produkowane przeciwciała są jeszcze poniżej ilości oznaczalnej (114). Neopteryna nie jest parametrem swoistym, jednak wzrost jej stężenia obserwujemy w całym szeregu infekcji, głównie wirusowych. Oznaczanie stężenia neopteryny może zmniejszyć ryzyko transmisji zakażenia w transfuzjologii.

Honlinger i wsp. badając stężenie neopteryny w surowicy u ponad 76 tysięcy krwiodawców, uznanych za zdrowych, u około 1,5% z nich stwierdził podwyższone stężenie NPT (115). U wielu z tych pacjentów dalsze badania ujawniły zakażenie wirusem cytomegalii lub pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*, które dotychczas było nieme klinicznie. Pozostałe osoby z tej grupy uznano za zakażone nieznanym patogenem, a ich krew nie została dopuszczona do przetoczeń.

W innym austriackim projekcie badawczym eliminując z przetoczenia krew, gdzie stężenie NPT wynosiło powyżej 10 nmol/l, poddano ją następnie weryfikacji badaniami serologicznymi. Rozpoznano zakażenie wirusem cytomegalii, Epstein-Barra, parvovirusem B 19, HCV (11).

Podobne spostrzeżenia, w doniesieniu z 2005 roku, opisują tureccy naukowcy. Oznaczali oni stężenie NPT w grupie 2760 dawców krwi. Stężenie NPT w surowicy równe lub wyższe 11 nmol/l miało 141 dawców (tj. 5,1% badanej grupy). Dalsze szczegółowe badania u tych osób, pozwoliły rozpoznać u nich rozmaite infekcje wirusowe, m. in. zakażenie adenowirusem (52).

Badania przesiewowe stężenia neopteryny u dawców krwi, nie tylko pozwalają wykryć ryzyko zakażenia całkowicie nieswoistą metodą, ale bardzo skutecznie podnoszą bezpieczeństwo transfuzji krwi (11). W austriackim Tyrolu, od roku 1986, zgodnie z prawem, każda krew przed przetoczeniem była poddana badaniu stężenia neopteryny. Obecnie obowiązujące od 1994 prawo narodowe nakazuje wykonywanie tego badania w całej Austrii, we wszystkich ośrodkach krwiodawstwa, jako badanie przesiewowe.

Współczesna transfuzjologia ma do rozwiązania dwa podstawowe problemy. Pierwszym jest znalezienie testów, które pozwolą zdiagnozować zakażenie w czasie trwania tzw. „okienka diagnostycznego”. W tym celu należy szukać testów o jeszcze wyższej wrażliwości (np. zastosowanie technik amplifikacji). Drugim problemem jest wykrycie zakażeń drobnoustrojami, dla których jeszcze nie istnieją specyficzne testy lub nie są stosowane rutynowo (116). W tej sytuacji przydatna wydaje się być neopteryna, zwłaszcza jak chodzi o infekcje wirusowe. Być może również w przypadku ptasiej grypy.

Fenyloketonuria - postać nietypowa

Przyczyną zaburzeń jakie obserwujemy w nietypowej postaci fenyloketonurii jest defekt biosyntezy koenzymu koniecznego do syntezy tyrozyny z fenyloalaniny, czyli 5,6,7,8-tetrahydrobiopteryny (BH4). W efekcie obserwujemy hiperfenyloalaninemię (13).

Defekt może wystąpić na różnych poziomach metabolizmu pterydyn. Jeśli dotyczy niedoboru enzymu GTP-cyklohydralazy-I (GTP-CH-I) będziemy obserwowali niskie stężenie BH4 i NPT. Wysokie stężenie poziomu neopteryny, przy niskim stężeniu BH4, wystąpi u osób z niedoborem syntetazy 6-pirogronianowej tetrahydropterynowej (*6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase*, PTPS). Oznaczenia pterydyn wykonywane są często w moczu.

Postać nietypowa stanowi 1-3% wszystkich zachorowań na fenuloketonurię, co oznacza zachorowanie 1:1 mln populacji. Dominują w tej postaci zaburzenia neurologiczne. Mimo wczesnego nawet wprowadzenia diety ubogofenyloalaninowej postępuje

degradacja psychiczna. Diagnostyka szczegółowa jest bardzo istotna, ponieważ istnieje możliwość leczenia chorych egzogenną biopteryną (BH4). Rozpoczęcie prawidłowego leczenia w pierwszych tygodniach życia dziecka zapewnia jemu prawidłowy rozwój, a brak leczenia prowadzi do wczesnego zgonu (117).

Choroby układu krążenia

Podwyższone stężenie neopteryny opisywano w miażdżycy naczyń wieńcowych (118,119), podkreślając tym samym udział procesu zapalnego w zaawansowanym etapie choroby. Wykazano zależność pomiędzy obecnością widocznych w badaniu angiograficznym zmian chorobowych, a stężeniem neopteryny w surowicy osób z niestabilną dusznicą bolesną (*angina pectoris*), co czyni NPT markerem aktywności chorób naczyń wieńcowych (120). U tych pacjentów określono stężenie NPT jako niezależny czynnik prognostyczny, oceniający ryzyko wystąpienia niepomyślnych „incydentów sercowych” (121).

Choroby wątroby

Na ostatniej, zorganizowanej w 2005 roku, Konferencji Naukowo-Szkoleniowej pt: „Postępy w Hepatologii” przedstawiono pracę dotyczącą przydatności oznaczania stężenia neopteryny w surowicy w diagnostyce chorób wątroby. Uznano, że oznaczanie stężenia NPT może być przydatne w różnicowaniu ostrych i przewlekłych zapaleń wątroby, bez względu na rodzaj czynnika etiologicznego choroby (porównywano zapalenia wirusowe i zapalenie toksyczne-alkoholowe) (122).

Brak przydatności oznaczania stężenia NPT w przewlekłych zapaleniach wątroby, jak i w przewidywaniu rozwoju marskości wątroby, opisywał wcześniej *Wilmer* (123). Obecnie opisano brak zależności między stężeniem NPT w moczu, a obrazem histopatologicznym i stopniem zaawansowania w innych niż poalkoholowe stłuszczenia wątroby (124).

Choroby wieku starczego, przebiegające z neurodegeneracją

Jest wiele doniesień, w których opisywany jest obserwowany wzrost stężenia neopteryny u ludzi zdrowych w starszym wieku (125,126). Wymagało to opracowania odrębnych wartości referencyjnych dla tej grupy wiekowej i nadal stanowi przedmiot dyskusji naukowych. Czy przyczyną tego jest początek rozmaitych patologii, które już

rozwijają się u osób w wieku podeszłym, a jeszcze nie dają dolegliwości klinicznych, pozostaje pytaniem otwartym (11).

Wiadomo, że choroby przebiegające z neurodegeneracją są ściśle związane z narastaniem stresu oksydacyjnego oraz pobudzeniem układu immunologicznego. Stąd, w chorobie Alzheimer'a, stężenie neopteryny w surowicy narasta korelując z pogorszeniem się sprawności umysłowej (127,128).

Podobne obserwacje dotyczące stężenia NPT poczyniono u chorych z płaswicą Huntingtona (129) i chorobą Creutzfeldta-Jakoba (130), co świadczy o przewlekłym pobudzeniu układu immunologicznego w tych schorzeniach i przyczynia się do lepszego poznania ich patogenez.

Badania przeprowadzone w 2005 roku wykazały wysokie stężenie NPT u badanych dorosłych osób z zespołem Downa (131).

1.3. Udział odpowiedzi immunologicznej organizmu w infekcjach (bakteryjnych i wirusowych)

Jak ogólnie wiadomo, w odpowiedzi immunologicznej organizmu możemy wyróżnić jej dwa zasadnicze typy: humoralną i komórkową. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że podział odpowiedzi immunologicznej na typ humoralny i komórkowy, należy uznać za teoretyczny.

Określony antygen na ogół wyzwała oba typy odpowiedzi immunologicznej, z mniejszą lub większą przewagą jednej z nich. Co więcej, odpowiedzi te przebiegają równolegle, ze wzajemnym oddziaływaniem między sobą. To, która z nich dominuje, zależne jest przede wszystkim od rodzaju antygeny, ale także jego postaci, sposobu i drogi działania.

W odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego udział biorą przeciwciała. Są one skuteczne w niszczeniu bakterii i toksyn, które znajdują się na zewnątrz komórek gospodarza. Miejsca, gdzie mogą namnażać się bakterie na zewnątrz komórek gospodarza, to: światło jelita, drogi oddechowe, układ moczowy, krew, tkanka łączna. Limfocyty B w odpowiedzi na działanie antygeny, przekształcają się w komórkę zdolną do produkowania i uwalniania przeciwciał, co dzieje się przy pomocy cytokin wydzielanych poprzez subpopulację limfocytów pomocniczych Th2. Przeciwbakteryjne

działanie przeciwciał oparte jest na wielorakich mechanizmach np. poprzez opsonizację, co ułatwia dalej fagocytozę (bakterii gram dodatnich), czy też aktywację dopełniacza na drodze klasycznej (w konsekwencji działanie bakteriobójcze na bakterie gram ujemne). (132,133,134)

W odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego udział biorą limfocyty T oraz aktywowane makrofagi. Limfocyty T cytotoksyczne (Tc) zabijają komórki ludzkie, które zostały zakażone wirusem, albo innym wewnątrzkomórkowym patogenem. Limfocyty T pomocnicze (Th1) uwalniają cytokiny, które pełniąc bardzo złożone funkcje, między innymi powodują, że do odpowiedzi immunologicznej włączają się granulocyty i makrofagi. Granulocyty i makrofagi są komórkami żernymi. Komórki żerne posiadają różne mechanizmy zabijania drobnoustrojów. W przypadku zbyt dużych rozmiarów patogenu (np. robaki) dochodzi do degranulacji leukocytów i zabijania zewnątrzkomórkowego. Główna droga zabijania jest jednak wewnątrzkomórkowa, gdzie działają mechanizmy tlenowe i pozatlenowe. Odpowiedź immunologiczna typu komórkowego uruchamiana jest w przebiegu infekcji wirusowych oraz zakażeń bakteriami wewnątrzkomórkowymi, których przykładem są: *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* i *Brucella*. Wirusy nie posiadają zdolności replikacji poza komórką gospodarza, dlatego są uznawane za bezwzględne pasożyty wewnątrzkomórkowe. Bakterie, które namnażają się wewnątrzkomórkowo, pozostają poza zasięgiem przeciwciał i dlatego wyzwalają zupełnie inne mechanizmy odporności niż bakterie, które namnażają się na zewnątrz komórek (132,133,134,135).

1.4. Udział odpowiedzi immunologicznej organizmu w chorobach o podłożu autoimmunologicznym (nieswoiste zapalenia jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów)

Do najczęstszych postaci **nieswoistych zapaleń jelit**, jakie występują u dzieci, zaliczamy: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (wzjg) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ch.L-C). Chociaż etiopatogeneza tych schorzeń nadal stanowi przedmiot wielu badań, do tej pory wiadomo, że udział w niej biorą czynniki genetyczne, środowiskowe

oraz immunologiczne. W momencie zachwiania równowagi między czynnikami prozapalnymi (bakterie jelitowe, enzymy trawienne, kwasy żółciowe, peptoglikany, lipopolisacharydy) a czynnikami protekcyjnymi (nieprzepuszczalna bariera śluzówkowa, śluz jelitowy, sekrecyjne immunoglobuliny, wybrane interleukiny, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kortyzon, somatostatyna) dochodzi do powstania stanu zapalnego. Dodatkowo udział w tym biorą wszelkie czynniki mające wpływ na homeostazę błony śluzowej jelit, a więc uwarunkowania genetyczne oraz czynniki środowiskowe (dieta, leki, tytoń) (136).

W przewlekłych zapaleniach jelit następuje uszkodzenie jelitowej bariery śluzówkowej, co prowadzi do wzmożonej przepuszczalności antygenów. We wzgł zmian ograniczone są do błony śluzowej jelita grubego, natomiast w ch. L-C dotyczą całej grubości ściany przewodu pokarmowego.

Odpowiedź układu immunologicznego w nieswoistych zapaleniach jelit zależna jest od właściwości patogenu oraz komórek prezentujących antygen (APC) pomocniczym limfocytom T. Dochodzi do aktywacji limfocytów T pomocniczych (Th). Dotychczas poznano dwa szlaki dalszego różnicowania się limfocytów pomocniczych Th: w kierunku limfocytów zapalnych (poprzez aktywację makrofagów)- limfocytów Th1 oraz indukujących odpowiedź humoralną (poprzez aktywację limfocytów B)- limfocytów Th2. Wiadomo, że niemal zawsze, kiedy uruchamiana jest odpowiedź immunologiczna organizmu, dochodzi do pobudzenia aktywności zarówno limfocytów Th1, jak i Th2, jednak w wielu schorzeniach jedna z tych subpopulacji dominuje (133).

Na podstawie danych klinicznych i prac doświadczalnych na ludziach i zwierzętach stwierdzono, że we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego następuje aktywacja odpowiedzi typu Th1 i Th2, gdzie przeważa pobudzenie limfocytów Th2. W chorobie Leśniowskiego- Crohna obserwuje się głównie odpowiedź związaną z pobudzeniem limfocytów Th1 (137,138,139).

Ostateczny rezultat odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit zależny jest od aktywności cytokin pozapalnych, przeciwzapalnych i immunomodulujących. Zarówno we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, jak i w chorobie Leśniowskiego- Crohna zachodzą zjawiska odporności humoralnej jak i komórkowej, choć można pokusić się o stwierdzenie, że we wzgł przeważają subpopulacje komórek wytwarzających cytokiny związane z humoralnym typem

odpowiedzi, a w ch. L-C subpopulacje komórek wydzielających cytokiny, które są odpowiedzialne za komórkowy typ odpowiedzi immunologicznej (140).

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (mizs) to najczęstsza przewlekła artropatia zapalna wieku rozwojowego. W etiopatogenezie tej choroby należy brać pod uwagę udział czynników środowiskowych, infekcyjnych, genetycznych, ale przede wszystkim główną rolę odgrywają zaburzenia immunologiczne, dotyczące odpowiedzi typu humoralnego, jak i komórkowego. Przerwanie fizjologicznej tolerancji własnych antygenów wyzwała dalsze procesy autoimmunizacji.

Mizs charakteryzuje się różnorodnością obrazu klinicznego oraz przebiegu choroby, a poszczególne podtypy schorzenia (klasyfikacja młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów umieszczona została w Aneksie) mogą mieć również nieco różną etiopatogenezę.

Zaburzenia równowagi między odpornością wrodzoną i nabytą, odpowiedzią komórkową i humoralną, do jakich dochodzi w przebiegu mizs, mogą stanowić uzasadnienie zaostrzeń i remisji w klinicznym przebiegu tej choroby (141).

2. CEL PRACY:

Celem pracy jest ocena przydatności klinicznej oznaczania stężenia neopteryny w surowicy w wybranych patologiach wieku rozwojowego.

Jako szczegółowe cele pracy przyjęto:

- Próba ustalenia wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci, z uwzględnieniem płci i wieku.
- Ocena przydatności klinicznej oznaczania stężenia neopteryny jako parametru różnicującego infekcje o etiologii wirusowej i bakteryjnej.
- Ocena przydatności klinicznej oznaczania stężenia neopteryny jako parametru monitorującego aktywność procesów immunologicznych w schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym (przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów).
- Ocena przydatności diagnostycznej oznaczania stężenia neopteryny w surowicy krwi względem innych wykładników procesu zapalnego, głównie prokalcytoniny i białka C-reaktywnego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pacjenci

Badaniami objętych zostało 381 pacjentów, w tym 172 dziewcząt (45,1%) oraz 209 chłopców (54,9%), w wieku od 1 miesiąca do 17,99 lat, średnio $8,4 \pm 6,4$ [SD] lat (mediana 7,9 lat).

Dzieci te leczone były w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku oraz w Oddziale Dziecięcym Szpitala Reumatologicznego w Sopocie, w okresie od października 2004 do czerwca 2005.

Wstępna kwalifikacja do badań odbywała się na podstawie rozpoznania, z jakim dzieci zgłaszały się do Kliniki lub Szpitala. Ostateczna kwalifikacja do poszczególnych grup prezentowanych w pracy dokonana została w oparciu o ustalone rozpoznanie.

Pacjenci podzieleni zostali na pięć grup.

Grupa 1 (grupa kontrolna) - dzieci zdrowe (105 dzieci), u których na podstawie badania podmiotowego, przedmiotowego oraz badań dodatkowych nie stwierdzono cech infekcji ostrej, ani przewlekłej. Byli to pacjenci zakwalifikowani do chirurgicznego lub ortopedycznego zaopatrzenia wad wrodzonych.

Wiek dzieci w grupie kontrolnej wahał się od 1 miesiąca do 17,99 lat (średnio $7,6 \pm 5,7$ [SD] lat; mediana 7,2 lat).

Oznaczone stężenia neopteryny w surowicy dzieci z tej grupy zostały wykorzystane do wyznaczenia wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy.

Pozostałe cztery grupy zawierały 276 dzieci w wieku od 1 miesiąca do 17,99 lat (średnio $8,7 \pm 6,6$; mediana 8,6), w tym 125 dziewcząt (45,3%) oraz 151 chłopców (54,7%).

Dzieci te zostały podzielone w zależności od rodzaju schorzenia:

Grupa 2 - dzieci z infekcjami przewodu pokarmowego (biegunkami), u których została ustalona etiologia (wirusowa, bakteryjna). Grupa ta liczyła 99 (35,9%) dzieci.

Grupa 3 - dzieci z zakażeniami układu moczowego o ustalonej etiologii (bakteryjnej). Grupa ta liczyła 28 (10,1%) dzieci.

Grupa 4 - pacjenci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit, z różnym stopniem aktywności choroby. Grupa ta liczyła 82 (29,7%) dzieci.

Grupa 5 - dzieci z rozpoznaniem młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, w okresie zaostrzenia i remisji choroby. Grupa ta liczyła 67 (24,3%) dzieci.

U wszystkich zakwalifikowanych dzieci przeprowadzono badanie pediatryczne, podmiotowe i przedmiotowe, a także laboratoryjne badania dodatkowe.

W badaniu podmiotowym szczególną uwagę zwracano na szczepienia ochronne. Dzieci szczepione w okresie ostatnich 4 tygodni zostały wyłączone z badań (142,143). Z badań wykluczono również dzieci, które bezpośrednio przed przyjęciem otrzymywały antybiotyki.

W czasie badania przedmiotowego dokonywano pomiaru masy i długości ciała. Nie zostały zakwalifikowane do dalszych badań dzieci, u których masa ciała odpowiadała na siatce centylowej wartościom poniżej 3 centyla, gdyż zgodnie ze współczesnymi poglądami niedożywienie białkowo- kaloryczne może powodować zaburzenia odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (144).

U wszystkich dzieci wykonano pomiar temperatury ciała.

W dodatkowych badaniach laboratoryjnych uwzględniono:

- badanie morfologii krwi z określeniem bezwzględnej liczby granulocytów, limfocytów, monocytów oraz wzorem odsetkowym leukocytów,
- oznaczenie stężenia białka C- reaktywnego (CRP) ,
- ocenę szybkości opadania krwinek czerwonych (OB) (dotyczy pacjentów Oddziału Dziecięcego Szpitala Reumatologicznego),
- pomiar stężenia neopteryny w surowicy,
- pomiar stężenia prokalcytoniny w surowicy,
- ocena stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy,
- badania mikrobiologiczne (posiewy moczu i kału).

Badania morfologii krwi wraz ze wzorem odsetkowym leukocytów oraz badanie OB przeprowadzone były metoda tradycyjną.

Pomiar stężenia CRP odbywał się przy użyciu testu lateksowego metodą immunoturbidymetryczną.

Mocznik oznaczany był metodą ureazową z GLDH, kreatynina metodą Jaffe, co pozwoliło ocenić wydolność nerek jako prawidłową u wszystkich badanych dzieci.

Wymienione powyżej badania dodatkowe należą do badań rutynowych, które wykonywane są przy przyjęciu do Kliniki/Szpitala u każdego pacjenta. U dzieci zakwalifikowanych do oznaczenia stężenia neopteryny oraz prokalcytoniny, pobierano w czasie wykonywania tych badań tylko nieco więcej krwi (1 kropla).

Krew ta, dokładnie zabezpieczona przed działaniem promieni słonecznych, maksymalnie 20 minut od pobrania, była odwirowywana (czas wirowania: 10 minut, ilość obrotów: 3 tysiące/min). Surowicę dzielono na dwie części (w celu niezależnego oznaczenia stężenia neopteryny i prokalcytoniny), a następnie zamrażano w temperaturze minus 20 stopni Celsjusza.

Wszystkie badania u dzieci prowadzone były za pisemną zgodą ich Rodziców/Opiekunów, którzy informowani byli o celu i założeniach pracy. Formularz zgody na przeprowadzenie badań umieszczono w Aneksie (Załącznik 1).

Na wykonanie powyższych badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Biotycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (NKEBN/942/2004).

Oznaczenia neopteryny i prokalcytoniny przeprowadzone były w Zakładzie Bakteriologii Klinicznej Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku, kierownik dr Julianna Kurlenda.

3.2. Oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy krwi

Oznaczenie stężenia neopteryny wykonywano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy pomocy zestawu do ilościowego oznaczania stężenia neopteryny w surowicy i osoczu. Ilość surowicy potrzebna do wykonania testu wynosi 50 mikrolitrów.

Producentem testu jest firma B.R.A.H.M.S.. Użyto zestawów do 96 i 384 (tj. 4 x 96) oznaczeń, o nazwie ELItest Neopterin (nr katalogowy odpowiednio 99.1 i 95.4). Jest to test wykorzystujący technikę opłaszczonych płytek.

Do dołków płytek opłaszczonych przeciwciałem przeciw-neopterynowym (przeciwciała poliklonalne, owcze) dodawano enzymatyczny koniugat (neopteryna/fosfataza alkaliczna) do standardów, surowic kontrolnych i surowic pacjentów. Neopteryna obecna w próbkach surowicy pacjentów konkurowała z koniugatem enzymatycznym o miejsca wiązania przeciwciał. Powstawał tym samym immunologiczny kompleks związany w fazie stałej, neopteryna/ przeciwciało przeciw-neopterynie lub neopteryna/koniugat enzymatyczny. Następnie wykonywano intensywne płukanie, co gwarantowało całkowite usunięcie wszystkich komponentów, które nie zostały związane. Dodanie roztworu substratu (fosforan 4-nitrofenylowy) pozwoliło na rozpoczęcie reakcji enzymatycznej, w czasie której fosfataza alkaliczna zawarta w koniugacie neopterynowo/enzymatycznym katalizowała rozpad fosforanu 4-nitrofenylowego, w wyniku czego powstał żółty 4-nitrofenol. Następnie poprzez alkalizację wodorotlenkiem sodowym reakcja enzymatyczna została zatrzymana. Intensywność koloru, która mierzona jest poprzez gęstość optyczną OD, zależała zatem od ilości związanego enzymu w stałej jednostce czasu zachodzenia reakcji. Stąd intensywność koloru była odwrotnie proporcjonalna do stężenia neopteryny w surowicy pacjenta. Podsumowując: niskiej gęstości optycznej odpowiadały wysokie wartości neopteryny.

Następnie gęstość optyczna mierzona była za pomocą czytnika płytek przy absorpcji maksymalnej 405 nm. Ostateczne wyniki otrzymano poprzez odczytanie stężenia neopteryny w poszczególnych badanych próbkach surowicy z krzywej standardowej. Krzywą standardową wykreślono odnosząc gęstości optyczne (oś Y, liniowa) do zdefiniowanych koncentracji standardów neopteryny (oś X, logarytmiczna) mając 5 lub 6 punktów. Poprawność wykonania poszczególnych pomiarów sprawdzano przy użyciu surowic kontrolnych I i II (kontrola negatywna i pozytywna), gdzie stężenie neopteryny wraz z odchyleniem standardowym podane było w załączonej do zestawu metryce.

Wykonanie testu na jednej płytce (96 oznaczeń) trwało około 3 godzin.

Neopteryna i jej wodne pochodne są wrażliwe na promienie słoneczne (145), stąd próbki surowic w czasie rozmrażania, standardy i znaczniki w czasie ogrzewania do temperatury pokojowej, muszą być zabezpieczone przed światłem.

Odczytu gęstości optycznej dokonano przy pomocy automatu z wbudowanym fotometrem ETI-STAR P002019, stosując długość fali 405 nm. Wartość próby ślepej (*blank*) została odjęta od gęstości optycznej otrzymanych wyników.

Producent testów, firma B.R.A.H.M.S., proponuje jako możliwą do przyjęcia wartość graniczną (*cut-off*) stężenia neopteryny w surowicy krwi 10 nmol/l. Zdecydowanie zaleca jednak, aby każde laboratorium opracowało swoje własne zakresy referencyjne/normy używając reprezentatywnej grupy pacjentów, a dane umieszczone w instrukcji do ELItest Neopterin traktować należy jedynie jako wskazówki dla oczekiwanych wartości.

3.3. Oznaczanie stężenia prokalcytoniny (PCT) w surowicy krwi

W oparciu o wiele doniesień, gdzie udowodniono kliniczną przydatność oznaczania stężenia prokalcytoniny (PCT) w surowicy krwi, istnieją w Polsce ośrodki, gdzie badanie to należy w chwili obecnej do rutynowych. Najczęściej stosowane są tam indywidualne szybkie testy paskowe, tzw. przyłóżkowe, gdzie wynik znany jest po 30 minutach od pobrania materiału. Są to testy półilościowe, immunochromatograficzne. Do najbardziej popularnych należy test B.R.A.H.M.S. PCT-Q.

W placówkach gdzie leczeni byli pacjenci włączeni do niniejszej pracy oznaczanie stężenia prokalcytoniny nie należy do badań rutynowych.

Pomiar stężenia prokalcytoniny u dzieci zakwalifikowanych do pracy dokonano metodą ilościową. Zastosowano test firmy B.R.A.H.M.S. o nazwie LIA PCT (nr katalogowy 54.1). Jest to test wykorzystujący metodę immunoluminometryczną. Istota tego testu polega na wiązaniu cząsteczki PCT przez dwa przeciwciała monoklonalne, z których jedno (ze znacznika) emituje sygnał luminescencyjny o sile proporcjonalnej do stężenia PCT w badanej próbce.

Schemat wykonywania oznaczeń był następujący: 20 mikrolitrów surowicy przenoszono pipetą do opłaszczonych przeciwciałami przeciw katakalcynie probówki. Wewnątrz probówki znajdowały się również znakowane luminescencyjnymi pochodnymi akrydyny przeciwciała przeciw kalcytoninie. Próbkę inkubowano w

temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, na mieszadle horyzontalnym, przez 1 godzinę.

Oznaczenia wykonywane były na luminometryze próbówkowym. Zmierzony sygnał luminescencji pierwotnie wyrażany w jednostkach RLU (*Relative Light Units*) został automatycznie przeliczony i przedstawiony w nanogramach/mililitr, co oznaczało właściwe stężenie prokalcytoniny w badanej próbce. Całkowity czas badania 100 próbek surowicy wynosił około 2 godzin. Do oznaczeń użyty został luminometr LB 9507 firmy Berthold. Czulość analityczna tego aparatu wynosi około 0,1 ng/ml

Wartości referencyjne dla stężenia prokalcytoniny w surowicy krwi przedstawiono w tabeli, wg: Meisner M.: *Procalcitonin (PCT). A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York, 2000, (146).

Tabela 2

Wartości referencyjne dla stężenia prokalcytoniny w surowicy krwi

Stężenie prokalcytoniny w surowicy krwi (ng/ml)	Stan kliniczny
poniżej 0,5	<ul style="list-style-type: none">- stan zdrowia (dla dzieci powyżej 3 doby życia),- przewlekłe procesy zapalne oraz choroby autoimmunologiczne,- infekcje wirusowe,- zlokalizowane infekcje bakteryjne, o łagodnym bądź umiarkowanym przebiegu.
od 0,5 do 2,0	<ul style="list-style-type: none">- uogólniony odczyn zapalny określany skrótem SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome),- uraz wielonarządowy,- rozległe oparzenia.
powyżej 2	<ul style="list-style-type: none">- infekcje bakteryjne o ciężkim przebiegu,- posocznice,- niewydolność wielonarządowa.

3.4. Metody statystyczne

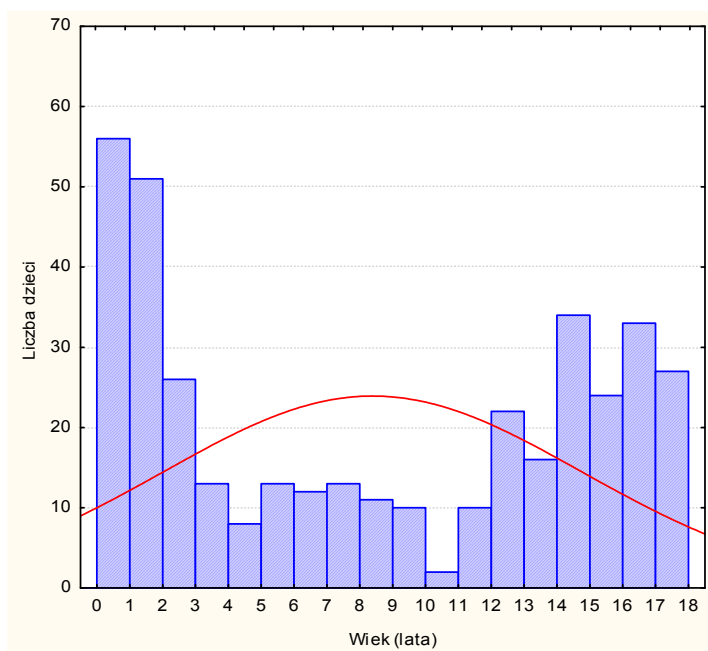
Uzyskane wyniki poddane zostały analizie statystycznej. Zastosowano następujące metody statystyczne: ocenę rozkładu parametrów ilościowych przeprowadzono w oparciu o histogramy oraz test Shapiro-Wilka. Do oceny parametrów ilościowych zastosowano test Manna – Whitney’a, test ANOVA Kruskal-Wallisa oraz test korelacji rang Spearmana. Do oceny parametrów jakościowych zastosowano test Pearsona χ^2 (chi-kwadrat) wprowadzając poprawkę Yates’a jeżeli oczekiwana liczebność podgrupy była mniejsza od 10. Do wyznaczenia wartości referencyjnych testu diagnostycznego zastosowano metodę podwójnego odchylenia standardowego oraz krzywą ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*). W wynikach analiz statystycznych podano obliczony poziom istotności p weryfikowanej hipotezy zerowej; wartości $p < 0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie (147,148). Obliczenia wykonano z wykorzystaniem pakietu oprogramowania statystycznego Statistica 7.1 (StatSoft Inc., USA).

4. WYNIKI

Ogółem w pracy analizie poddano 381 pacjentów (dzieci zdrowe i chore), w tym 172 dziewcząt (45,1%) oraz 209 chłopców (54,9%).

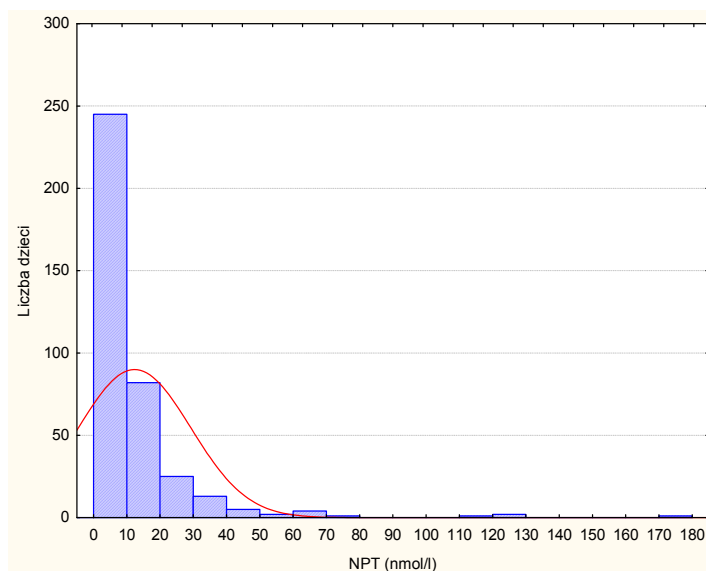
Wiek wszystkich badanych pacjentów mieścił się w przedziale: od 1 miesiąca do 17,99 lat i wynosił średnio $8,4 \pm 6,4$ [SD] lat (mediana 7,9 lat). Badania nie dotyczyły noworodków.

Rozkład wieku dla całej badanej populacji przedstawiono na rycinie (Rycina 4). Obserwowany rozkład wieku różnił się statystycznie znamienne od rozkładu normalnego ($p < 0,001$).



Rycina 4
Rozkład wieku w całej badanej populacji

Oznaczone stężenia neopteryny (NPT) w surowicy w całej analizowanej populacji dzieci (N=381) wahały się od 2,811 do 171,033 nmol/l (średnio $12,353 \pm 16,898$ [SD] nmol/l, mediana 6,337). Rozkład wartości stężenia NPT w surowicy wszystkich badanych dzieci przedstawiono na rycinie (Rycina 5). Obserwowany rozkład wartości różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p < 0,001$).



Rycina 5

Rozkład wartości stężenia NPT w surowicy w całej badanej populacji

Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badań (N=381) podzieleni zostali na pięć grup.

Grupa 1 (grupa kontrolna) - dzieci zdrowe (105 dzieci), u których na podstawie badania podmiotowego, przedmiotowego oraz badań dodatkowych nie stwierdzono cech infekcji ostrej, ani przewlekłej. Oznaczone stężenia neopteryny w surowicy dzieci z tej grupy zostały wykorzystane do wyznaczenia wartości referencyjnych.

Pozostałe 276 dzieci chorych (grupa badana) zostało podzielonych na cztery grupy, w zależności od rodzaju schorzenia.

Grupa 2 - dzieci z **infekcjami przewodu pokarmowego** (biegunkami), u których została ustalona etiologia zakażenia (wirusowa, bakteryjna). Grupa ta liczyła 99 (35,9%) dzieci.

Grupa 3 - dzieci z **zakażeniami układu moczowego** o ustalonej etiologii (bakteryjnej). Grupa ta liczyła 28 (10,1%) dzieci.

Grupa 4 - pacjenci z **przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit** (choroba Leśniowskiego- Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego), o różnym stopniu aktywności choroby. Grupa ta liczyła 82 (29,7%) dzieci.

Grupa 5 - dzieci z rozpoznaniem **młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów**, w okresie zaostrzenia i remisji. Grupa ta liczyła 67 (24,3%) dzieci.

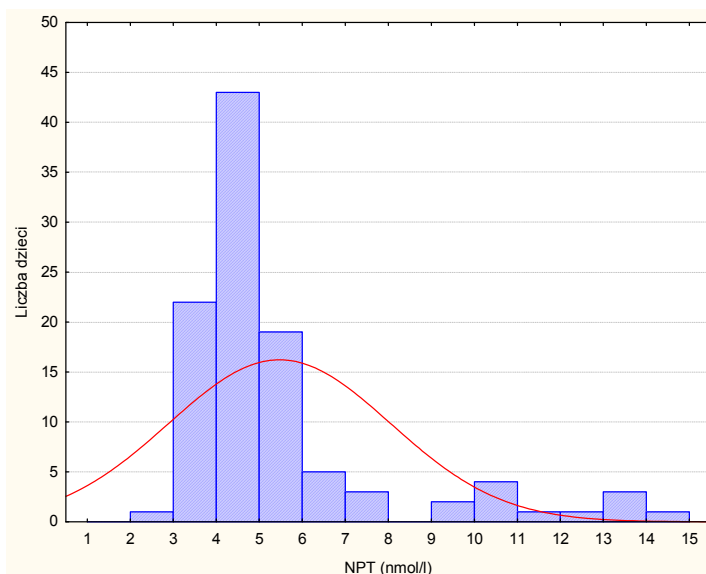
4.1. Ustalenie wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci zdrowych (Grupa 1- kontrolna), z uwzględnieniem płci i wieku

4.1.1. Grupa kontrolna (dzieci zdrowe)

W grupie kontrolnej (dzieci zdrowe) było 105 dzieci, w tym 47 dziewcząt (44,8%) oraz 58 chłopców (55,2%).

Wiek dzieci w grupie kontrolnej wahał się od 1 miesiąca do 17,99 lat (średnio $7,6 \pm 5,7$ [SD] lat; mediana 7,2).

Stężenie neopteryny w surowicy dzieci w grupie kontrolnej mieściło się w zakresie od 2,872 do 14,779 nmol/l (średnio $5,471 \pm 2,582$ [SD] nmol/l, mediana 4,734). Rozkład wartości stężenia NPT w surowicy w tej grupie dzieci różnił się statystycznie znacząco od rozkładu normalnego ($p < 0,001$) –Rycina 6.

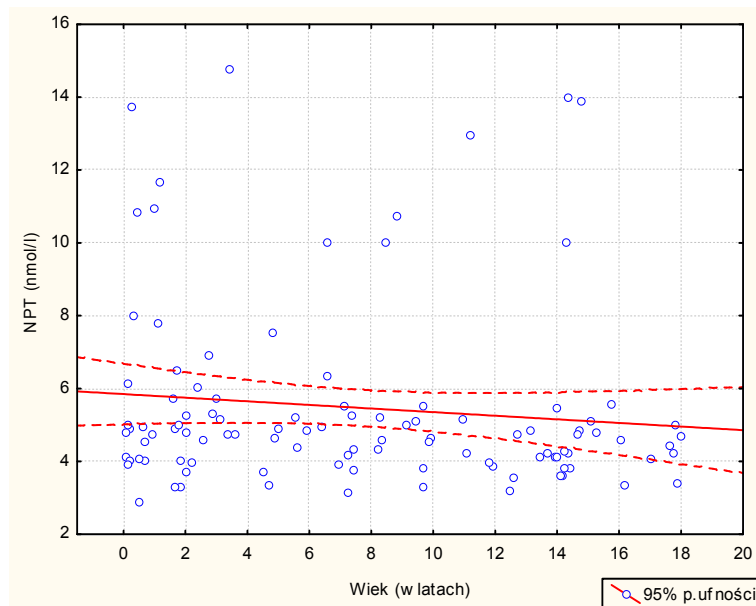


Rycina 6

Rozkład wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie kontrolnej

Zależność stężenia NPT w surowicy od wieku dzieci w grupie kontrolnej.

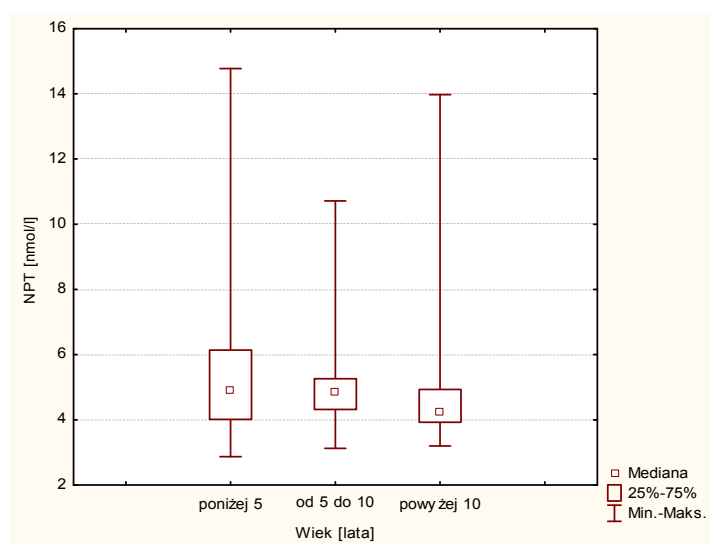
Nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji wieku dzieci z wartością stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie kontrolnej ($R_s = -0,16$; $p = 0,10$; Rycina 7).



Rycina 7

Zależność stężenia NPT w surowicy od wieku dzieci w grupie kontrolnej

Aby potwierdzić powyższe dane dzieci zakwalifikowane do grupy kontrolnej dodatkowo podzielono na trzy przedziały wiekowe: poniżej 5 lat, 5-10 lat oraz powyżej 10 lat. Ilustruje to rycina (Rycina 8). Analizę szczegółową zawiera tabela (Tabela 3-Aneks).



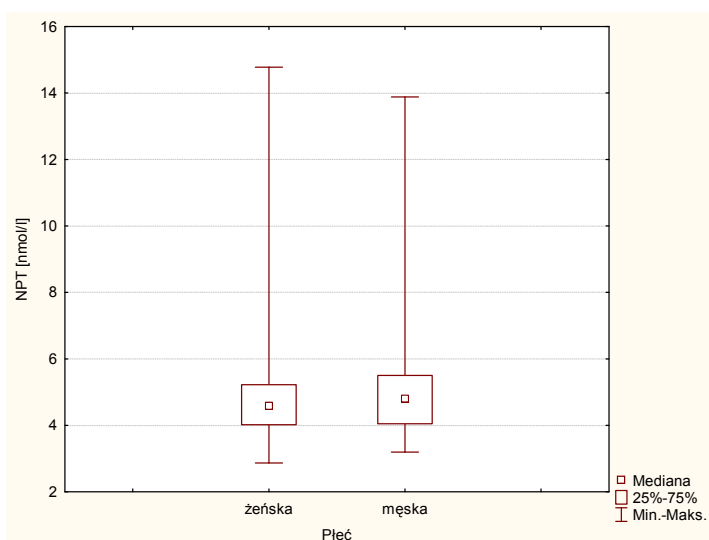
Rycina 8

Wartość stężenia NPT w surowicy u dzieci w poszczególnych przedziałach wiekowych

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy wartości stężenia NPT w surowicy pomiędzy poszczególnymi przedziałami wiekowymi u dzieci ($p=0,13$; Rycina 8, Tabela 3- Aneks).

Zależność stężenia NPT w surowicy od płci dzieci w grupie kontrolnej.

W grupie kontrolnej było 105 dzieci, w tym 47 dziewcząt (44,8%) oraz 58 chłopców (55,2%). Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy stężenia NPT w surowicy pomiędzy dziećmi obojga płci ($p=0,35$; Rycina 9, Tabela 4- Aneks).

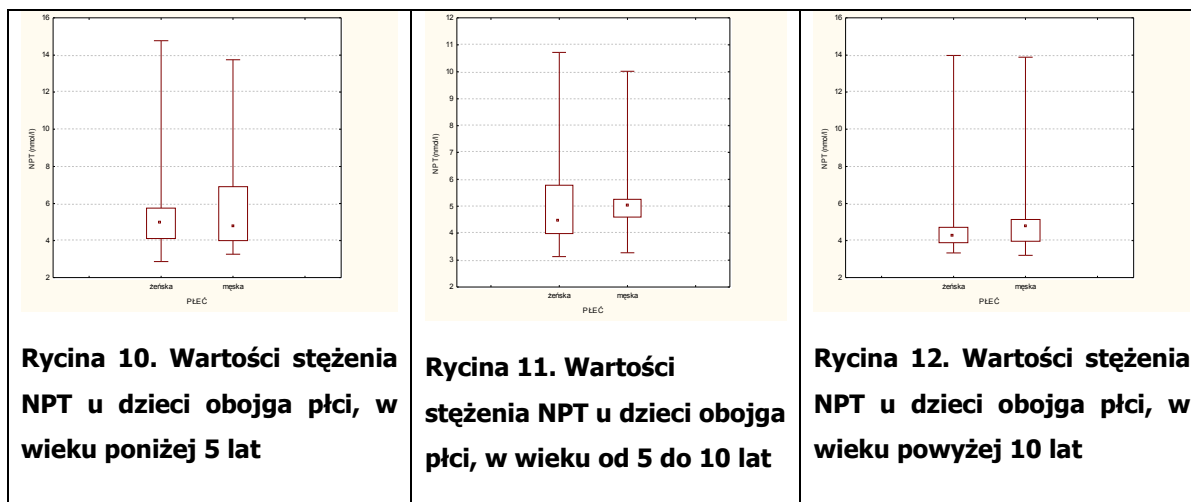


Rycina 9

Zależność stężenia NPT w surowicy od płci dzieci w grupie kontrolnej

Zależność stężenia NPT w surowicy dzieci względem płci i wieku.

Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic wartości NPT pomiędzy płciami w żadnym z przedziałów wiekowych 'poniżej 5', 'od 5 do 10' oraz 'powyżej 10' lat, odpowiednio: $p=0,80$; Rycina 10 oraz $p=0,41$; Rycina 11, oraz $p=0,25$; Rycina 12.



Rycina 10. Wartości stężenia NPT u dzieci obojga płci, w wieku poniżej 5 lat

Rycina 11. Wartości stężenia NPT u dzieci obojga płci, w wieku od 5 do 10 lat

Rycina 12. Wartości stężenia NPT u dzieci obojga płci, w wieku powyżej 10 lat

4.1.2. Grupa badana (dzieci chore)

W grupie badanej (dzieci chore) było 276 dzieci w wieku od 1 miesiąca do 17,99 lat (średnio $8,7 \pm 6,6$ [SD] lat; mediana 8,6), w tym 125 dziewcząt (45,3%) oraz 151 chłopców (54,7%).

Stężenie NPT w surowicy dzieci w grupie badanej (N= 276) wahało się od 2,811 do 171,033 nmol/l (średnio $14,970 \pm 19,160$ [SD] nmol/l, mediana 8,724).

4.1.3. Ustalenie wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci zdrowych

Metoda: 2 x Odchylenie Standardowe [SD]

Na podstawie zasady „średnia + 2 x Odchylenie Standardowe [SD]” jako metody ustalenia górnego zakresu wartości referencyjnych można ustalić wartości stężenia NPT w surowicy dla całej grupy kontrolnej (N=105) oraz dla poszczególnych przedziałów wiekowych (Tabela 5).

Tabela 5

Ustalenie górnego zakresu wartości referencyjnych stężenia NPT w surowicy metodą 2xSD

		Liczba dzieci	Średnie stężenie NPT (nmol/l)	SD	Średnia + 2xSD	Po zaokrągleniu
Cała grupa kontrolna		105	5,471	2,582	10,635	11
Przedział wieku	Poniżej 5 lat	43	5,781	2,746	11,273	11
	Od 5 do 10 lat	26	5,287	1,963	9,213	9
	Powyżej 10 lat	36	5,235	2,795	10,825	11

Przyjęcie wartości stężenia NPT=11 nmol/l w surowicy jako poziomu odcięcia (*cut-off*) jednakowego dla wszystkich badanych dzieci, niezależnie od wieku, prowadzi do swoistości wynoszącej 94,3% oraz czułości wynoszącej 42,8% dla wykonywanego testu (Tabela 6).

Tabela 6

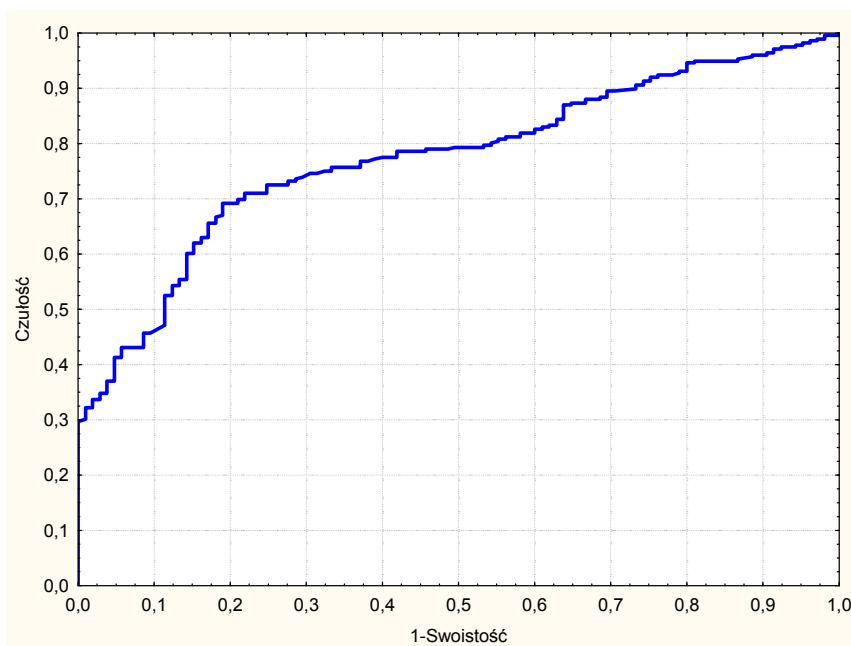
Czułość i swoistość testu dla poziomu odcięcia (*cut-off*) NPT=11 nmol/l

Podział dzieci na grupy	Liczba dzieci ze stężeniem NPT		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej <i>cut-off</i> (11 nmol/l)	powyżej <i>cut-off</i> (11 nmol/l)	
GRUPA BADANA (chore)	158 (57,25%)	118 (42,75%)	276
GRUPA KONTROLNA (zdrowe)	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
Ogółem	257	124	381

Na podstawie powyżej zebranych danych można obliczyć wartość predycyjną testu dodatniego, która wynosi PPV= 95,16 % oraz wartość predycyjną testu ujemnego NPV= 38,52 %.

Metoda: ROC

Metoda ROC (*Receiver Operating Characteristic Curves*) umożliwia graficzne przedstawienie dokładności diagnostycznej testu. Jest ona często stosowana w analizie użyteczności testów medycznych. Krzywa ROC jest to wykres czułości jako funkcji wartości: 1-swoistość. Krzywą ROC (*ROC Curve*) dla całej badanej populacji przedstawiono na rycinie (Rycina 13). Pole pod krzywą ROC (AUC, *Area Under Curve*) wynosi $0,775 \pm 0,024$ [SE] (95% CI 0,728-0,822).



Rycina 13

Krzywa ROC dla całej badanej populacji

Nie uwidoczniło żadnych istotnych punktów charakterystycznych (tzw. punktów przegięcia), które spowodowałyby istotne podwyższenie czułości lub swoistości testu w całej badanej populacji. Pole pod krzywą wynoszące $0,775 \pm 0,024$ [SE] oznacza dość dobrą swoistość testu.

Podsumowanie

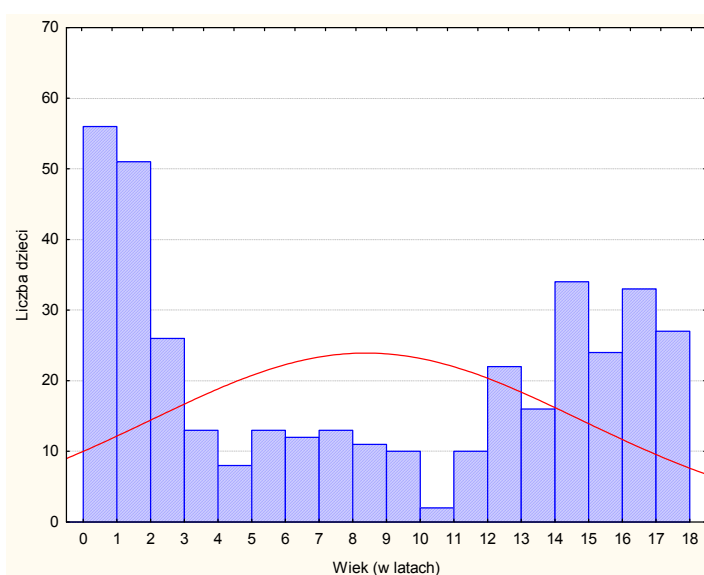
Obserwowane wartości stężenia NPT w surowicy cechowały się dużą rozpiętością zarówno w grupie kontrolnej (dzieci zdrowe) jak i w grupie badanej (dzieci chore). Swoistość testu dla całej populacji wyznaczona na podstawie metody podwójnego odchylenia standardowego przy poziomie odcięcia (*cut-off*) 11 nmol/l wyniosła 94,3%, a czułość 42,8%. W związku z tym do dalszej analizy danych postanowiono odnieść się do uznanej metody wyznaczania zakresu wartości referencyjnych metodą podwójnego odchylenia standardowego i ustalić **punkt odcięcia niezależny od wieku i płci dzieci na poziomie 11 nmol/l**.

4.2. Stężenie NPT w surowicy w poszczególnych grupach dzieci chorych (różnice pomiędzy rozpoznaniem).

W grupie wszystkich badanych dzieci chorych było 276 pacjentów w wieku od 1 miesiąca do 17,99 lat (średnio $8,7 \pm 6,6$ [SD] lat; mediana 8,6), w tym 125 dziewcząt (45,3%) oraz 151 chłopców (54,7%). Rozkład wieku dzieci w tej grupie przedstawia Rycina 14 i Tabela 7 (Aneks).

Rycina 14

Rozkład wieku w całości grupy dzieci chorych



Wśród 276 badanych chorych dzieci wyróżniono następujące grupy, w zależności od ustalonego rozpoznania:

Grupa 2 - (BIEGUNKI)- dzieci z infekcjami przewodu pokarmowego (biegunkami), u których została ustalona etiologia (wirusowa, bakteryjna). Grupa ta liczyła 99 (35,9%) dzieci.

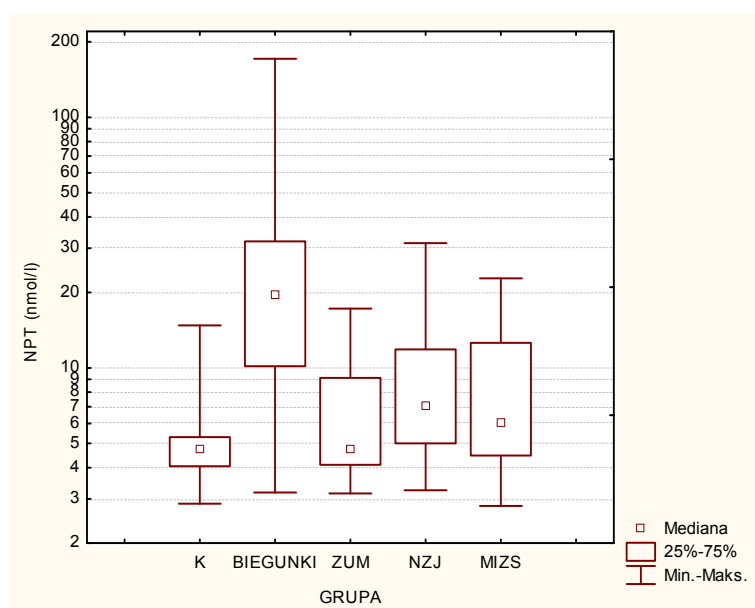
Grupa 3 - (ZUM)- dzieci z zakażeniami układu moczowego o ustalonej etiologii (bakteryjnej). Grupa ta liczyła 28 (10,1%) dzieci.

Grupa 4 - (NZJ)- pacjenci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit, z różnym stopniem aktywności choroby. Grupa ta liczyła 82 (29,7%) dzieci.

Grupa 5 - (MIZS)- dzieci z rozpoznaniem młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, w okresie zaostrzenia i remisji. Grupa ta liczyła 67 (24,3%) dzieci.

Stężenie NPT w surowicy w całej grupie badanych dzieci chorych (N= 276) wahało się od 2,811 do 171,033 nmol/l (średnio $14,970 \pm 19,160$ [SD] nmol/l, mediana 8,724).

Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci, w grupach wydzielonych dla poszczególnych rozpoznań przedstawiono w tabeli (Tabela 8- Aneks) oraz na rycinie (Rycina 15).



Rycina 15

Wartości stężenia NPT w surowicy u dzieci z poszczególnymi rozpoznaniem (skala logarytmiczna), K-grupa kontrolna

Obserwowano statystycznie istotną różnicę wobec grupy kontrolnej stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie 2: BIEGUNKI ($p < 0,001$), w grupie 4: NZJ ($p < 0,001$) oraz w grupie 5: MIZS ($p = 0,002$), ale nie w grupie 3: ZUM ($p = 0,39$).

Stężenie NPT w surowicy dzieci w grupie 2: BIEGUNKI było zdecydowanie najwyższe i różniło się statystycznie istotnie od wszystkich innych grup ($p < 0,01$).

Częstość występowania wyników dodatnich (przekraczających wyznaczoną wartość graniczną: 11 nmol/l) u dzieci z poszczególnymi rozpoznaniem przedstawiono w tabeli (Tabela 9). Obserwowane różnice w częstości występowania wyników dodatnich były znamienne statystycznie ($p < 0,001$).

Tabela 9

Wyniki dodatnie (powyżej przyjętej wartości granicznej) stężenia NPT w surowicy dzieci z poszczególnymi rozpoznaniem

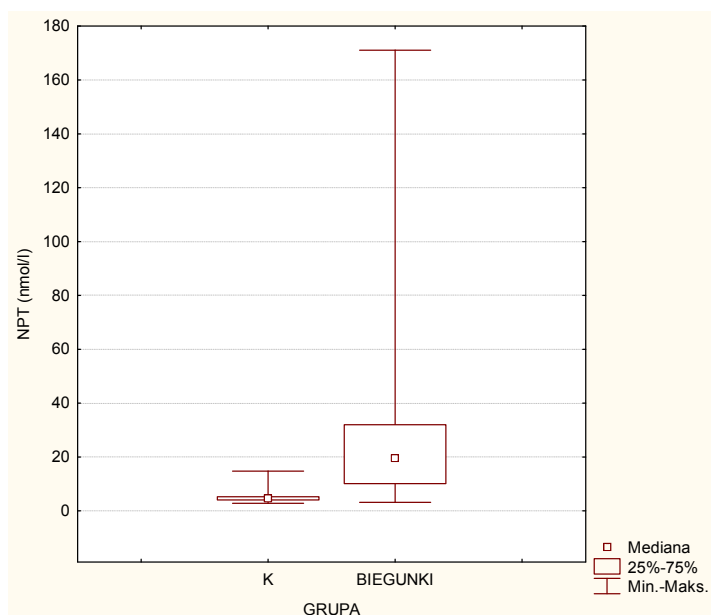
GRUPA	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
BIEGUNKI	29 (29,29%)	70 (70,71%)	99
ZUM	23 (82,14%)	5 (17,86%)	28
NZJ	59 (71,95%)	23 (28,05%)	82
MIZS	47 (70,15%)	20 (29,85%)	67
Ogółem dzieci	257	124	381

4.3. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z biegunką (Grupa 2)

Porównanie z grupą kontrolną

Do grupy 2: BIEGUNKI zakwalifikowano 99 pacjentów, w tym 44 dziewczęta (44,4%) oraz 55 chłopców (55,5%), w wieku od 0,1 do 12,5 lat (średnio $2,4 \pm 2,5$ [SD] lat, mediana 1,6).

W grupie tej obserwowano statystycznie istotną różnicę wartości stężenia NPT w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$; Tabela 10- Aneks; Rycina 16) oraz częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l ($p < 0,001$; Tabela 11 - Aneks).



Rycina 16

Wartości stężenia NPT w surowicy w grupie 2: BIEGUNKI w porównaniu do grupy kontrolnej (K)

Korelacja NPT z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

Nie obserwowano statystycznie istotnej zależności stężenia NPT z temperaturą ciała (N=98; $R_s=0,19$; $p=0,13$; Rycina 17- Aneks), OB (N=4; $R_s=-0,8$; $p=0,20$; Rycina 18- Aneks), CRP (N=99; $R_s=-0,16$; $p=0,12$; Rycina 19- Aneks), ilością leukocytów (N=99; $R_s=-0,15$; $p=0,13$; Rycina 20- Aneks), ale obserwowano statystycznie istotną, choć słabą ujemną korelację stężenia NPT z PCT (N=99; $R_s=-0,20$; $p=0,04$; Rycina 21- Aneks).

Wartości stężenia NPT w zależności od etiologii biegunki (bakteryjna vs wirusowa)

W badanej grupie 2: BIEGUNKI było 32 pacjentów z biegunką o etiologii bakteryjnej (Enteropatogenna Escherichia coli (EPEC), Salmonella) oraz 67 dzieci z biegunką o etiologii wirusowej (Rotawirusy, Adenowirusy). Obserwowano statystycznie istotne różnice wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od etiologii biegunki

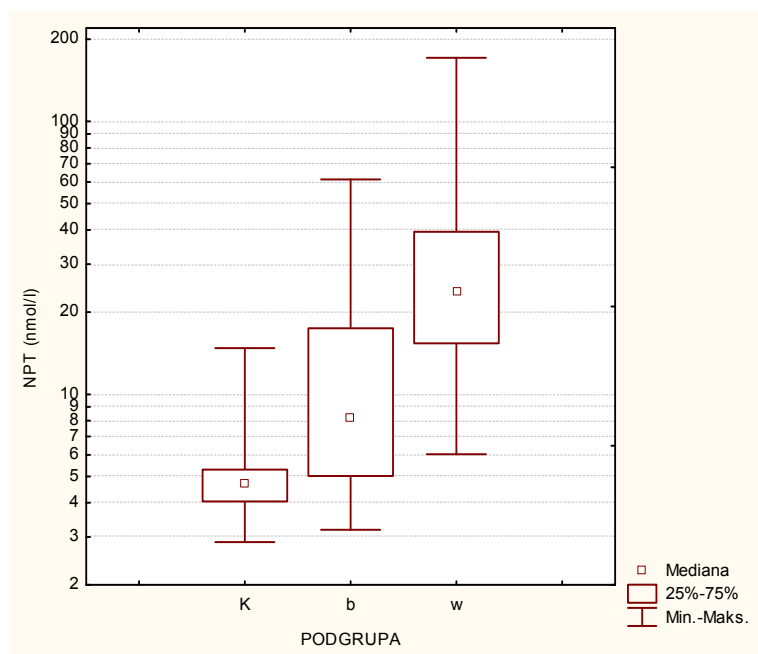
(bakteryjna vs wirusowa) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (dla każdego porównania $p < 0,001$) – Tabela 12, Rycina 22.

Obserwowano statystycznie istotną różnicę częstości występowania wyników dodatnich (przekraczających wyznaczoną wartość graniczną: 11 nmol/l) stężenia NPT w zależności od etiologii biegunki ($p < 0,001$) – Tabela 13.

Tabela 12

Wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od etiologii biegunki (bakteryjna/wirusowa)

Etiologia biegunki	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Bakteryjna	32	12,435	8,247	3,187	61,291	11,545
Wirusowa	67	33,387	23,735	6,029	171,033	30,570



Rycina 22

Wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od etiologii biegunki (b- bakteryjna/w- wirusowa) w grupie 2: BIEGUNKI w porównaniu do grupy kontrolnej (K)

Tabela 13

Częstość występowania wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy w zależności od etiologii biegunki

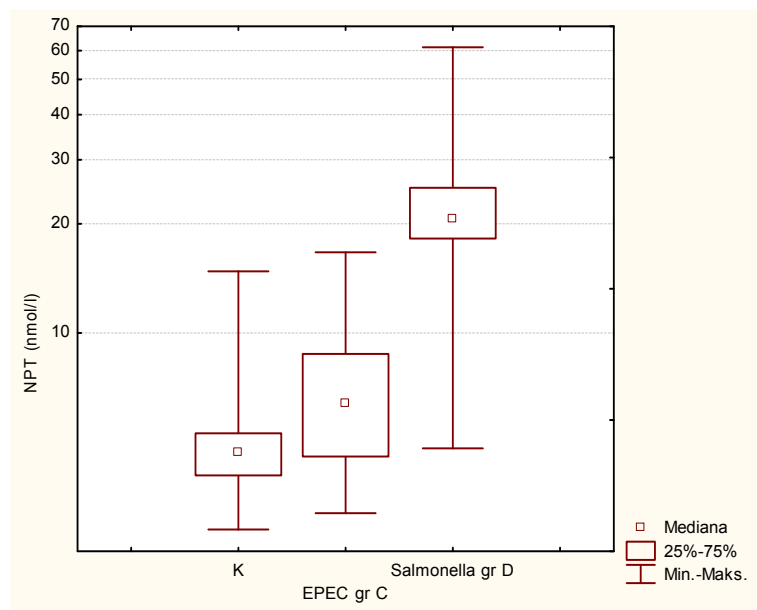
Etiologia biegunki	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
bakteryjna	20 (62,50%)	12 (37,50%)	32
wirusowa	9 (13,43%)	58 (86,57%)	67
Ogółem dzieci	29	70	99

W podgrupie biegunek o etiologii bakteryjnej nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji stężenia NPT w surowicy z temperaturą ciała (N=32; $R_s=0,30$; $p=0,10$), z CRP (N=32; $R_s=0,16$; $p=0,38$), liczbą leukocytów (N=32; $R_s=-0,05$; $p=0,78$), ani z PCT (N=32; $R_s=0,12$; $p=0,53$). W tej podgrupie tylko u jednej osoby był określony poziom OB stąd nie było możliwości analizy korelacji NPT z OB.

W podgrupie biegunek o etiologii wirusowej nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji stężenia NPT w surowicy z temperaturą ciała (N=66; $R_s=0,20$; $p=0,10$), CRP (N=67; $R_s=0,23$; $p=0,06$), liczbą leukocytów (N=67; $R_s=-0,07$; $p=0,53$), ani z PCT (N=67; $R_s=0,03$; $p=0,081$). W tej podgrupie tylko u 3 pacjentów miało określony poziom OB, stąd nie udało się określić zależności NPT i OB.

Wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od rodzaju bakterii, jako czynnika etiologicznego biegunki

Obserwowano statystycznie istotną różnicę wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od rodzaju bakterii, jako czynnika etiologicznego biegunki ($p<0,001$) – Tabela 14- Aneks, Rycina 23, także w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobnie częstość występowania wyników dodatnich, tj. powyżej przyjętej wartości granicznej: 11 nmol/l różniła się znamienne ($p<0,001$) – Tabela 15.



Rycina 23

Wartość stężenia NPT w surowicy w zależności od rodzaju bakterii, jako czynnika etiologicznego biegunki, K-grupa kontrolna

Tabela 15

Częstość występowania wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy, w zależności od rodzaju bakterii, jako czynnika etiologicznego biegunki (EPEC= Enteropatogenne E. coli)

Grupy		Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
		poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA		99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
Etiologia bakteryjna biegunki	EPEC gr C	19 (86,36%)	3 (13,64%)	22
	Salmonella gr D	1 (10,00%)	9 (90,00%)	10
Ogółem dzieci		119	18	137

Wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od rodzaju wirusa, jako czynnika etiologicznego biegunki

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy wartości stężenia NPT w surowicy w podgrupie dzieci z biegunką wirusową, pomiędzy rodzajami wirusa: Rotawirus vs Adenowirus, jako czynnika etiologicznego biegunki ($p=0,47$, Tabela 16, Rycina 24-Aneks).

Tabela 16

Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w zależności od rodzaju wirusa, jako czynnika etiologicznego biegunki

Etiologia wirusowa biegunki	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Rotawirusy	60	33,607	23,358	6,029	171,033	32,013
Adenowirusy	7	31,501	34,319	11,915	49,275	14,040

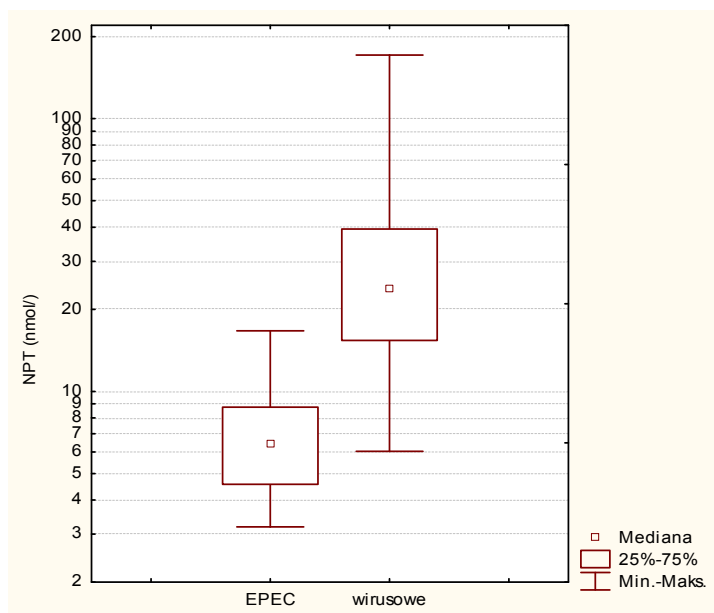
Porównanie wartości stężenia NPT w surowicy dzieci z biegunką o etiologii bakteryjnej (EPEC) i wirusowej

Obserwowano statystycznie istotną różnicę wartości stężenia NPT w surowicy chorych z biegunką, pomiędzy dziećmi zakażonymi bakteriami EPEC (Enteropatogenne E. coli) i wirusami (Rotawirusy i Adenowirusy) ($p<0,001$; Tabela 17; Rycina 25). Obserwowano także statystycznie istotną różnicę w częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy tych dzieci ($p<0,001$; Tabela 18- Aneks).

Tabela 17

Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci z biegunką, zakażonych bakteriami EPEC i wirusami

Etiologia biegunki	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Bakterie EPEC	22	7,326	6,414	3,187	16,693	3,528
Wirusy	67	33,387	23,735	6,029	171,033	30,570



Rycina 25

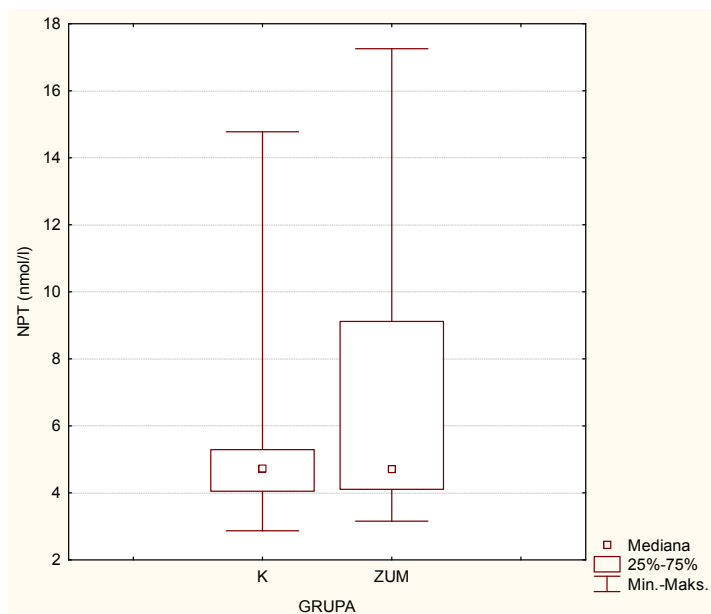
Wartość stężenia NPT w surowicy u dzieci z biegunką, zakażonych bakteriami EPEC i wirusami

4.4. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z zakażeniami układu moczowego (Grupa 3)

Porównanie z grupą kontrolną

W grupie 3: dzieci zakażeniami układu moczowego (ZUM) badanych było 28 pacjentów, w tym 18 dziewcząt (64,3%) oraz 10 chłopców (35,7%), w wieku od 1 miesiąca do 17,5 lat (średnio $4,0 \pm 4,9$ [SD] lat, mediana 1,9).

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy wartości stężenia NPT w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,39$; Tabela 19- Aneks; Rycina 26), ani częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy ($p=0,09$); Tabela 20- Aneks.



Rycina 26

Wartość stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie 3: ZUM w porównaniu do grupy kontrolnej (K)

Korelacja NPT z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

Nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji stężenia NPT w surowicy z temperaturą ciała (N=28; $R_s=-0,03$; $p=0,88$; Rycina 27-Aneks), OB (N=7; $R_s=-0,21$; $p=0,64$; Rycina 28- Aneks), CRP (N=28; $R_s=-0,17$; $p=0,39$; Rycina 29- Aneks), ilością leukocytów (N=28; $R_s=-0,14$; $p=0,48$; Rycina 30- Aneks), ani PCT (N=28; $R_s=-0,10$; $p=0,60$; Rycina 31- Aneks).

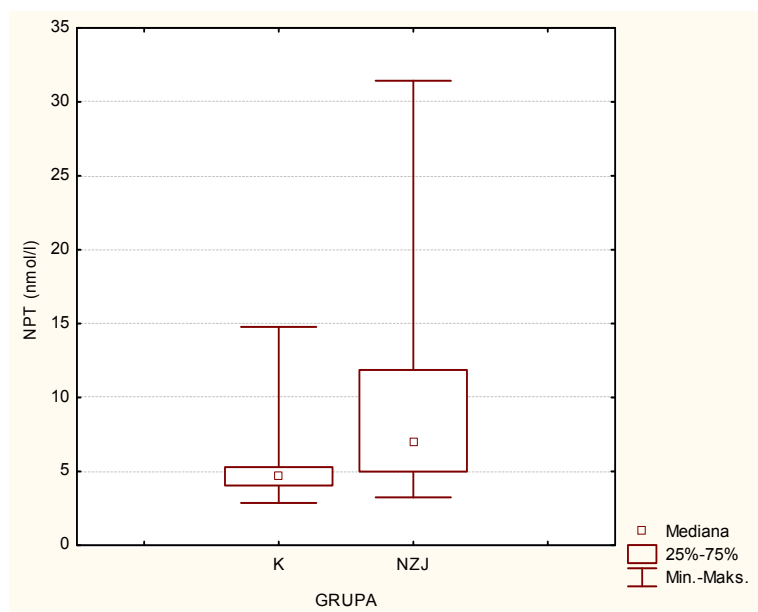
4.5. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit (Grupa 4)

Porównanie z grupą kontrolną

W grupie 4: dzieci z rozpoznaniem nieswoistym zapaleniem jelit (NZJ) było badanych 82 pacjentów, w tym 27 dziewcząt (32,9%) oraz 55 chłopców (67,1%) w wieku od 1,4 roku do 18,0 lat (średnio $13,9 \pm 4,1$ [SD] lat, mediana 15,4).

Obserwowano statystycznie istotną różnicę stężenia NPT w surowicy dzieci z grupy NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) - Tabela 21- Aneks, Rycina 32.

Obserwowano także statystycznie istotną różnicę częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy pomiędzy tymi grupami ($p < 0,001$) - Tabela 22- Aneks.



Rycina 32

Wartość stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie NZJ (nieswoiste zapalenie jelit) w porównaniu do grupy kontrolnej (K)

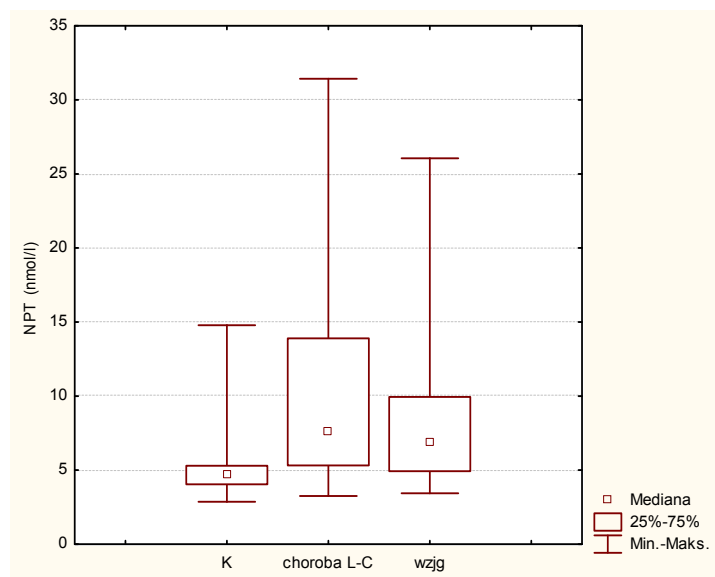
Korelacja NPT z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

Obserwowano statystycznie istotną dodatnią korelację wartości stężenia NPT z temperaturą ciała ($N=82$; $R_s=0,33$; $p < 0,002$; Rycina 33- Aneks), OB ($N=71$; $R_s=0,62$; $p < 0,001$; Rycina 34- Aneks), CRP ($N=80$; $R=0,55$; $p < 0,001$; Rycina 35- Aneks), liczbą leukocytów ($N=82$; $R_s=0,32$; $p=0,003$; Rycina 36- Aneks), ale nie ze stężeniem PCT ($N=82$; $R_s=0,21$; $p=0,06$; Rycina 37- Aneks).

Wartość stężenia NPT u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit, w zależności od postaci (choroba Leśniowskiego- Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego)

Nie obserwowano różnicy statystycznie istotnej stężenia NPT w surowicy pomiędzy pacjentami z różnymi postaciami nieswoistych zapaleń jelit: chorobą Leśniowskiego- Crohna (choroba L-C) i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (wzjg) ($p=0,45$), choć wartości stężenia NPT w surowicy w obu rodzajach NZJ były statystycznie znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej ($p<0,01$) - Tabela 23- Aneks, Rycina 38.

Podobnie nie obserwowano różnicy statystycznie istotnej częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających wyznaczoną wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy u dzieci z różnymi postaciami nieswoistych zapaleń jelit ($p=0,09$), ale były obserwowane różnice statystycznie istotne wobec grupy kontrolnej ($p<0,05$) - Tabela 24.



Rycina 38

Wartość stężenia NPT w surowicy w zależności od postaci NZJ, K- grupa kontrolna

Tabela 24

Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy w zależności od postaci NZJ

GRUPA	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11 nmol/l	powyżej 11 nmol/l	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
choroba L-C	21 (61,76%)	13 (38,24%)	34
wzjg	38 (79,17%)	10 (20,83%)	48
Ogółem dzieci	158	29	187

Pogrupa dzieci z chorobą Leśniowskiego- Crohna

W podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (choroba L-C) badanych było 34 pacjentów, w tym 11 (32%) dziewcząt i 23 (68%) chłopców, w wieku od 1,4 roku do 18 lat (średnio $14,3 \pm 4,3$ [SD] lat, mediana 15,2). Wartości stężenia NPT w surowicy w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego- Crohna w porównaniu do grupy kontrolnej przedstawia Tabela 25- Aneks.

W podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego- Crohna obserwowano statystycznie istotną dodatnią korelację stężenia NPT w surowicy z temperaturą ciała (N=32, $R_s=0,36$, $p=0,04$, Rycina 39- Aneks), OB (N=32, $R_s=0,59$, $p<0,001$, Rycina 40- Aneks) oraz CRP (N=34, $R_s=0,55$, $p<0,001$, Rycina 41- Aneks), ale nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji stężenia NPT w surowicy z liczbą leukocytów (N=34, $R_s=0,19$, $p=0,27$, Rycina 42- Aneks), ani z PCT (N=34, $R_s=0,20$, $p=0,26$, Rycina 43- Aneks).

Zależność stężenia NPT w surowicy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit od stopnia aktywności choroby w podgrupie dzieci z rozpoznaniem: choroba Leśniowskiego-Crohna

U wszystkich dzieci z rozpoznaniem przewlekłego nieswoistego zapalenia jelit stopień aktywności choroby oceniano w oparciu o powszechnie stosowane skale. Dla dzieci z chorobą Leśniowskiego- Crohna określano pediatryczny wskaźnik aktywności choroby Crohna (Pediatric Crohn's Disease Activity Index- PCDAI) w modyfikacji Ryzki i Wojnarowskiego (149). Skala ta umieszczona została w Aneksie- Tabela 26.

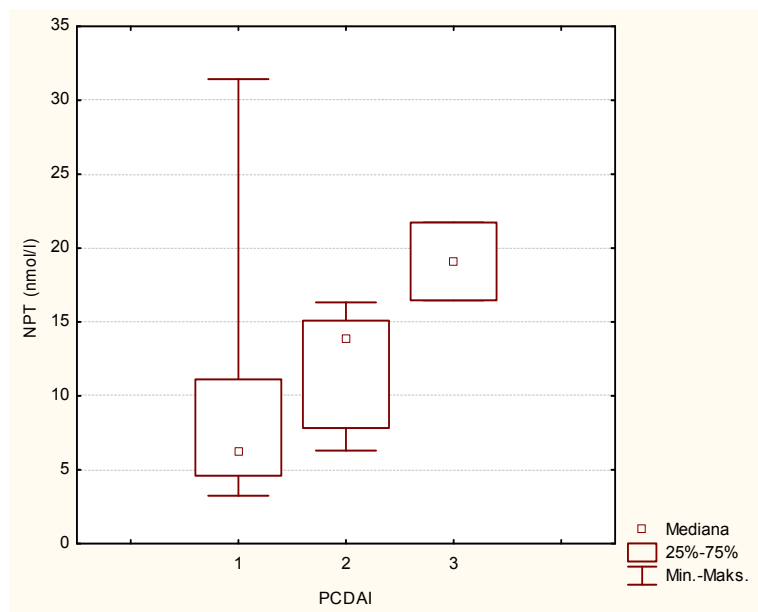
W podgrupie dzieci z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego- Crohna obserwowano statystycznie istotne różnice stężenia NPT w surowicy w zależności od stopnia aktywności choroby ($p=0,03$, Tabela 27, Rycina 44) oraz obserwowano statystycznie istotną dodatnią korelację tych wartości ($R_s=0,58$, $p<0,001$).

Różnice częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT nie osiągnęły znamienności statystycznej ($p=0,054$; Tabela 28), ale najprawdopodobniej wynika to ze zbyt małej liczebności podgrupy z ciężką postacią choroby ($N=2$).

Tabela 27

Stężenie NPT w zależności od stopnia aktywności choroby (1-postać łagodna, 2-średnia, 3-ciężka) w podgrupie dzieci z rozpoznaniem: choroba Leśniowskiego-Crohna

Stopień aktywności choroby	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
1	23	8,099	6,202	3,250	31,432	6,002
2	9	11,773	13,895	6,295	16,326	4,170
3	2	19,094	19,094	16,460	21,723	3,718



Rycina 44

Zależność stężenia NPT od stopnia aktywności choroby w skali PCDAI (1-postać łagodna, 2-średnia, 3-ciężka) w podgrupie dzieci z rozpoznaniem: choroba Leśniowskiego- Crohna

Tabela 28

Częstość wyników dodatnich w zależności od stopnia aktywności choroby w skali PCDAI (1-postać łagodna, 2-średnia, 3-ciężka) w podgrupie dzieci z rozpoznaniem: choroba Leśniowskiego- Crohna

Stopień aktywności choroby	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
1	17 (73,91%)	6 (26,09%)	23
2	4 (44,44%)	5 (55,56%)	9
3	0 (0,00%)	2 (100,00%)	2
Ogółem dzieci	21	13	34

Pogrupa dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

W podgrupie dzieci z chorobą wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego badanych było 48 pacjentów, w tym 16 (33%) dziewcząt i 32 (67%) chłopców, w wieku od 3,9 do 17,8 lat (średnio $13,5 \pm 4,0$ [SD] lat, mediana 15,4). Wartości stężenia NPT w surowicy w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do grupy kontrolnej przedstawiono w Tabeli 29- Aneks.

W podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego obserwowano statystycznie istotną dodatnią korelację stężenia NPT w surowicy z temperaturą ciała (N=48, $R_s=0,33$, $p=0,02$, Rycina 45- Aneks), OB (N=39, $R_s=0,65$, $p<0,001$, Rycina 46- Aneks), CRP (N=46, $R_s=0,59$, $p<0,001$, Rycina 47- Aneks) oraz liczbą leukocytów (N=48, $R_s=0,44$, $p=0,002$, Rycina 48- Aneks), ale nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji stężenia NPT w surowicy z PCT (N=48, $R_s=0,24$, $p=0,10$, Rycina 49- Aneks).

Zależność stężenia NPT w surowicy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit od stopnia aktywności choroby w podgrupie dzieci z rozpoznaniem: wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Dla dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stopień aktywności choroby oceniano w oparciu o powszechnie stosowaną skalę Trulove-Wittsa, w modyfikacji Ryżki i Wojnarowskiego (149). Skala ta umieszczona została w Aneksie- Tabela 30.

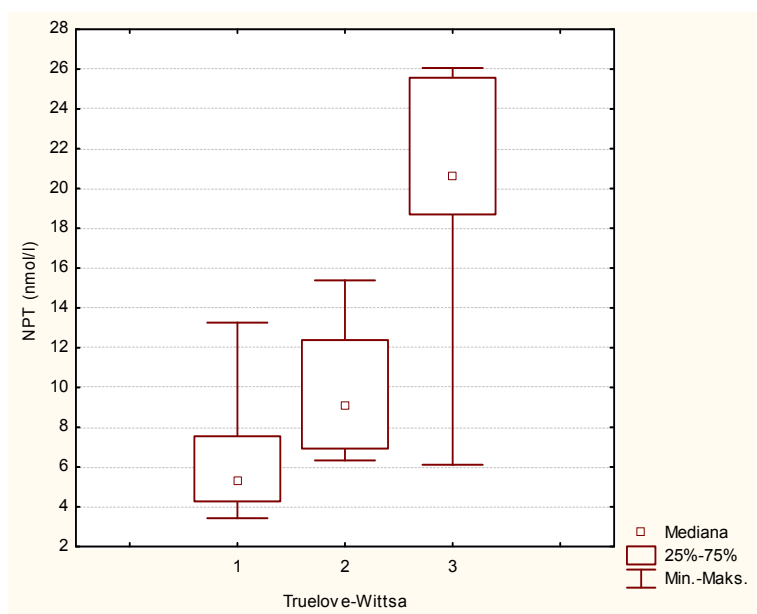
W podgrupie dzieci, u których rozpoznano wrzodziejące zapalenie jelita grubego obserwowano statystycznie istotne różnice stężenia NPT w surowicy w zależności od skali aktywności choroby- skali Truelove-Wittsa w modyfikacji Ryżki i Wojnarowskiego ($p=0,01$, Tabela 31, Rycina 50) oraz statystycznie istotną dodatnią korelację między nimi ($R_s=0,64$; $p<0,001$).

Obserwowano także statystycznie istotną różnicę i korelację częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy w zależności od stopnia aktywności choroby w tej podgrupie chorych ($p<0,001$, Tabela 32).

Tabela 31

Wartości stężenia NPT w surowicy w zależności od stopnia aktywności choroby w skali Truelove-Wittsa (1-postać łagodna, 2-umiarkowana, 3-ciężka) w podgrupie dzieci z rozpoznaniem wzjg

Stopień aktywności choroby	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
1	30	6,165	5,280	3,436	13,258	2,371
2	12	9,829	9,066	6,337	15,382	3,127
3	6	19,630	20,675	6,118	26,052	7,253



Rycina 50

Zależność stężenia NPT w surowicy od stopnia aktywności choroby w skali Truelove-Wittsa (1-postać łagodna, 2-umiarkowana, 3-ciężka) w podgrupie dzieci z rozpoznaniem wzjg

Tabela 32

Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy w zależności od stopnia aktywności choroby (1-postać łagodna, 2-umiarkowana, 3-ciężka) w skali Truelove-Wittsa w podgrupie dzieci z rozpoznaniem wzjg

Stopień aktywności choroby	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
1	29 (96,67%)	1 (3,33%)	30
2	8 (66,67%)	4 (33,33%)	12
3	1 (16,67%)	5 (83,33%)	6
Ogółem dzieci	38	10	48

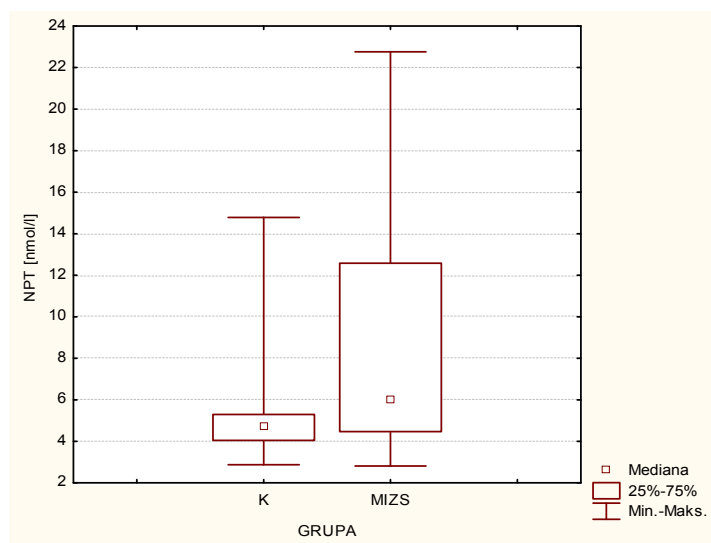
4.6. Stężenie neopteryny w surowicy dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (Grupa 5)

Porównanie z grupą kontrolną

W grupie 5: dzieci z rozpoznaniem młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (MIZS) badanych było 67 pacjentów, w tym 36 dziewcząt (53,7%) oraz 31 chłopców (46,3%), w wieku od 3,8 do 17,9 lat (średnio $13,7 \pm 3,4$ [SD] lat, mediana 14,4).

Obserwowano statystycznie istotną różnicę wartości stężenia NPT w surowicy w grupie MIZS w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$; Tabela 33- Aneks; Rycina 51).

Obserwowano także statystycznie istotną różnicę częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy tych dzieci ($p < 0,001$; Tabela 34- Aneks).



Rycina 51

Wartość stężenia NPT w surowicy w grupie 5: MIZS w porównaniu do grupy kontrolnej (K)

Korelacja NPT z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

Nie obserwowano statystycznie istotnych zależności wartości stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała (N=67; $R_s=0,00$; $p=0,97$; Rycina 52- Aneks), OB (N=66; $R_s=0,09$; $p=0,47$; Rycina 53- Aneks), CRP (N=67; $R_s=-0,14$; $p=0,25$; Rycina 54- Aneks), liczby leukocytów (N=67; $R_s=-0,05$; $p=0,70$; Rycina 55- Aneks), ani PCT (N=67; $R_s=0,07$; $p=0,56$; Rycina 56- Aneks).

Zależność stężenia NPT w surowicy od postaci młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów

Przebieg kliniczny pierwszych 6 miesięcy choroby (uznawany jako okres początkowy) warunkuje dalszy przebieg kliniczny schorzenia, jakim jest młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS). Jako trzy podstawowe typy początku (postaci) choroby uznaje się: uogólniony, skąpostawowy (zajęcie 1-4 stawów) oraz wielostawowy.

Nie obserwowano statystycznie istotnej zależności stężenia NPT w surowicy od poszczególnych postaci MIZS ($p=0,40$; Tabela 35). Nie obserwowano także statystycznie istotnej różnicy częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy chorych dzieci ($p=0,20$; Tabela 36- Aneks).

Tabela 35

Zależność stężenia NPT w surowicy od postaci MIZS

Postać MIZS	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Systemowa	9	10,613	13,784	2,811	18,015	6,387
Skąpostawowa	34	7,474	5,255	3,281	15,056	3,970
Wielostawowa	24	8,710	6,347	3,976	22,765	4,896

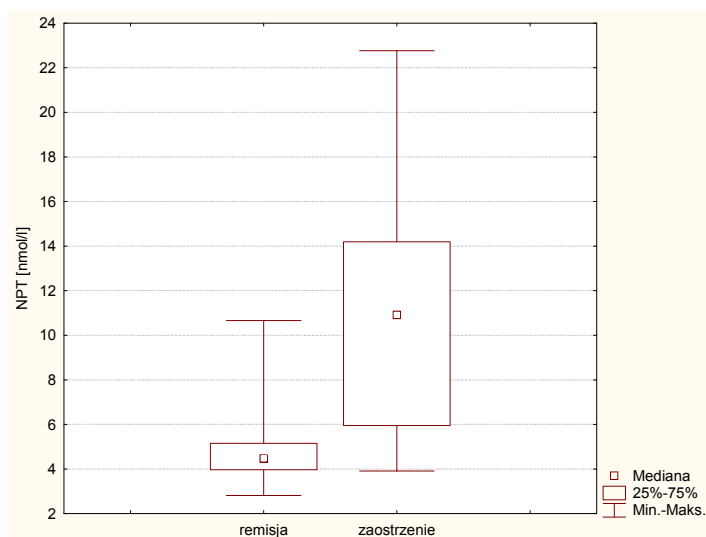
Zależność stężenia NPT od remisji/zaostżenia przebiegu choroby w grupie dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów

Obserwowano statystycznie istotną różnicę wartości stężenia NPT w zależności od remisji/zaostżenia przebiegu choroby w grupie dzieci z mizs ($p<0,001$; Tabela 37; Rycina 57). Także częstości występowania wyników dodatnich, tj. przekraczających przyjętą wartość graniczną: 11 nmol/l, stężenia NPT w surowicy różniły się statystycznie znamienne ($p<0,001$; Tabela 38).

Tabela 37

Zależność stężenia NPT w surowicy od remisji/zaostżenia przebiegu choroby w grupie dzieci z MIZS

Przebieg MIZS	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Remisje	27	5,021	4,471	2,811	10,658	1,900
Zaostrzenia	40	10,578	10,912	3,914	22,765	4,754



Rycina 57

Zależność stężenia NPT w surowicy od remisji/zaostwienia choroby w grupie dzieci z MIZS

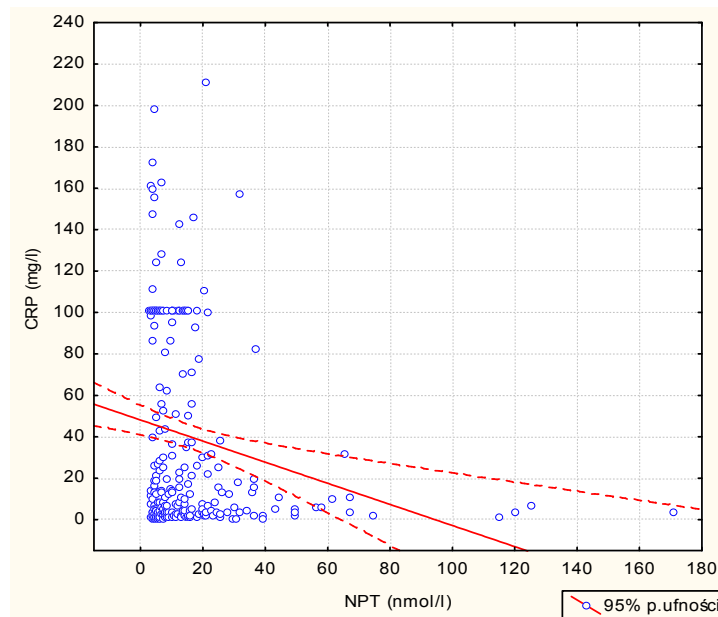
Tabela 38

Częstość występowania wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy w zależności od remisji/zaostwienia przebiegu choroby w grupie dzieci z MIZS

Obraz kliniczny choroby	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
REMISJA	27 (100,00%)	0 (0,00%)	27
ZAOSTRZENIE	20 (50,00%)	20 (50,00%)	40
Ogółem dzieci	47	20	67

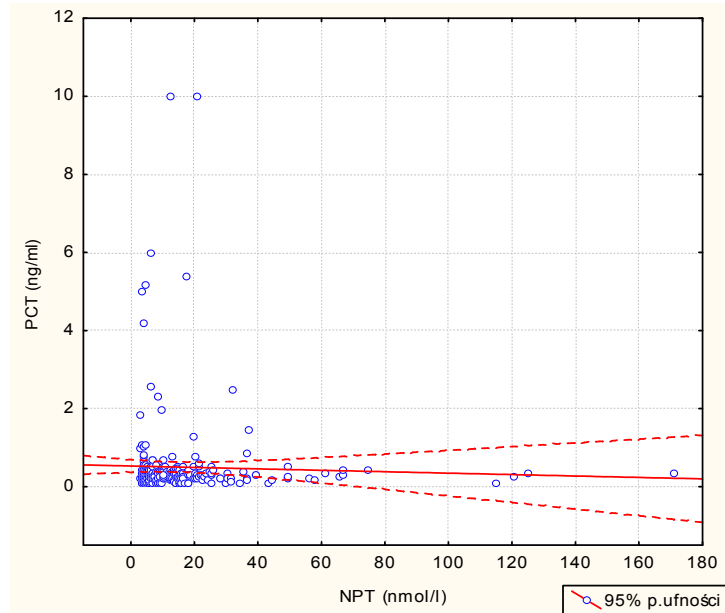
4.7. Ocena korelacji stężenia neopteryny z innymi parametrami stanu zapalnego (białko C-reaktywne, prokalcytonina) w grupie dzieci chorych

W grupie dzieci chorych obserwowano statystycznie istotną, lecz bardzo słabą korelację stężenia NPT w surowicy i wartości białka C-reaktywnego (CRP) (N=274; $R_s=-0,13$; $p=0,03$; Rycina 58), lecz nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji stężenia NPT w surowicy z wartościami prokalcytoniny (PCT) (N=276; $R_s=-0,06$; $p=0,30$; Rycina 59).



Rycina 58

Korelacja stężenia NPT w surowicy ze stężeniem CRP



Rycina 59

Korelacja stężenia NPT w surowicy ze stężeniem PCT

5. DYSKUSJA

Jednym ze wskaźników aktywności odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, który można obecnie oznaczać w różnych płynach ustrojowych jest neopteryna.

Układ limfatyczny składa się z narządów i naczyń limfatycznych oraz krążących limfocytów. W momencie narodzin człowieka populacja obwodowych limfocytów T jest prawie kompletna. Grasica, narząd, w którego obrębie następuje dojrzewanie limfocytów T, powstaje i jest czynna od pierwszych tygodni życia płodowego, a swój pełen rozwój osiąga pod koniec życia prenatalnego.

Dojrzewanie odporności komórkowej odbywa się w życiu płodowym równolegle w odniesieniu do różnicowania i dojrzewania narządów limfatycznych. Ilości leukocytów i limfocytów obecne we krwi obwodowej noworodka wykazują ścisłą współzależność z czasem trwania ciąży, przebiegiem porodu, obecnością zakażenia wewnątrzmacicznego. Odporność humoralna noworodka, która opiera się ona na immunoglobulinach klasy G pochodzących od matki, wykazuje znaczącą niedojrzałość. W okresie noworodkowym następują dalsze złożone procesy adaptacyjne, dotyczące również mechanizmów odporności (150).

Dla potwierdzenia rozwoju odporności komórkowej już w okresie płodowym w jednym z doniesień opisano przeprowadzone badania surowicy płodu, które wykazały, że stężenie neopteryny rośnie wraz z wiekiem ciążowym, osiągając najwyższe wartości w trzecim trymestrze ciąży. Wówczas stężenie NPT w surowicy płodu jest trzykrotnie wyższe od stężenia NPT w surowicy matki (stężenie NPT w surowicy matki nie koreluje z czasem trwania ciąży) (151).

Dalsze badania dotyczące noworodków wykazały, że we krwi pępowinowej średnie stężenie neopteryny wynosi $17,4 \pm 4,0$ nmol/l. Na podstawie tych wyników jako górną granicę normy stężenia NPT we krwi pępowinowej przyjąć należy 25 nmol/l. Badano również surowicę 27 zdrowych noworodków, gdzie średnie stężenie neopteryny wyniosło $32,6 \pm 16,4$ nmol/l, a wartość graniczna została ustalona na poziomie aż 65 nmol/l, bez względu na płeć noworodka.

Względnie zbliżone wyniki uzyskali w swojej pracy *Parrak* i wsp. badając 41 zdrowych noworodków, u których średnie stężenie NPT w surowicy wyniosło $22,6 \pm 12,5$ nmol/l. Drugą badaną grupę w pracy *Parraka* i wsp. stanowiły noworodki z podejrzeniem

infekcji (118 dzieci). Średnie stężenie NPT w surowicy tych dzieci było wyższe i wynosiło $24,7 \pm 17,4$ nmol/l, jednak różnica ta względem grupy noworodków zdrowych nie była znamienne statystycznie. Znamienne wyższe były natomiast wartości stężenia prokalcytoniny w grupie noworodków chorych. Autorzy zastanawiali się, czym można tłumaczyć otrzymane wyniki: doбором grupy, podejrzeniem infekcji w momencie wykonywania badania, czy też zależnością od czynnika etiologicznego infekcji. Jednak z racji obserwowanego wzrostu stężenia neopteryny w surowicy, rozwój odporności komórkowej u tych dzieci, uznali oni za prawidłowy (152).

Normy stężenia neopteryny w surowicy ludzi zdrowych różnią się w zależności od źródła, z którego pochodzą dane. Rozbieżności dotyczą przede wszystkim występowania różnic stężenia NPT zależnie od wieku i płci. Dane, dotyczące dorosłych i dzieci, które zostały aktualnie zgromadzone przez jednego z producentów testów (firma B.R.A.H.M.S.) i pochodzą z wielu ośrodków prowadzących badania, pokazują, że w 97,2% przypadków stężenie neopteryny oznaczane w surowicy ludzi zdrowych mieści się poniżej 10 nmol/l. Dlatego też, powszechnie jako normę stężenia neopteryny w surowicy krwi można przyjąć stężenie poniżej wartości granicznej (tzw. *cut-off*), wynoszącej 10 nmol/l. Trzeba jednak w tym miejscu zdecydowanie podkreślić, że wszyscy producenci testów zalecają opracowanie przez poszczególne laboratoria własnych zakresów referencyjnych (informacja ta zawarta jest w instrukcji dołączonej do każdego testu). Wpływ na wyznaczane wartości referencyjne mogą mieć między innymi różnice etniczne, regionalne.

Należy zaznaczyć, że w literaturze światowej istnieje niewiele doniesień na temat wartości referencyjnych stężenia NPT w surowicy u dzieci i młodzieży. W znamienitej większości badania te obejmują populację ludzi dorosłych. W literaturze polskiej nie znaleziono ani jednego doniesienia dotyczącego wyznaczenia wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci i młodzieży.

W niniejszej pracy do grupy kontrolnej zakwalifikowano 105 zdrowych dzieci, obojga płci, w wieku od 1 miesiąca życia do 18 roku życia. Grupa dzieci objęta badaniami własnymi nie dotyczyła noworodków.

Stężenie neopteryny w surowicy tych dzieci wahało się w zakresie od 2,872 do 14,779 nmol/l (średnio $5,471 \pm 2,582$ [SD] nmol/l, mediana 4,734). Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wyznaczono zakres wartości referencyjnych tego parametru

metodą podwójnego odchylenia standardowego. Ustalono **wartość graniczną (tzw. cut-off) stężenia neopteryny w surowicy, niezależnie od wieku i płci dzieci, na poziomie 11 nmol/l.**

Przedstawione wyniki stanowią pewien wkład do wciąż trwającej dyskusji odnośnie wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci, młodzieży i dorosłych (Tabela 39).

Werner i wsp (39) w 1987 roku badali stężenie neopteryny w surowicy 662 zdrowych ochotników, w wieku od 1 do 97 lat. Stwierdzili oni, że stężenie neopteryny w surowicy krwi nie zależy od płci, natomiast jest zależne od wieku.

W grupie 263 zdrowych dzieci, w wieku od 1 do 18 lat (mediana 12), stężenie neopteryny w surowicy wahało się w zakresie od 2,7 do 28,0 nmol/l i wynosiło średnio $6,78 \pm 3,6$ [SD] nmol/l (mediana 6,0). Ustalono wartość graniczną dla całej tej grupy wiekowej na poziomie 13,5 nmol/l.

U osób dorosłych, między 19 a 75 rokiem życia, gdzie badaniami objęto 359 osób, stężenie neopteryny w surowicy wahało się w zakresie od 1,0 do 33,6 nmol/l i wynosiło średnio 5,34 nmol/l. Jako wartość graniczną przyjęto 8,7 nmol/l.

Natomiast w czterdziestoosobowej grupie, w wieku powyżej 76 lat stężenie neopteryny w surowicy wahało się w zakresie od 2,9 do 30,0 nmol/l i wynosiło średnio 9,67 nmol/l. Ustalono wartość graniczną dla tej grupy wiekowej na poziomie 19 nmol/l.

Podobne, wyższe, wartości stężenia NPT w surowicy ludzi w wieku podeszłym opisuje również cały szereg innych autorów: *Ledochowski* (125), *Reibnegger* (153), *Murr* (154), *Frick* (155).

Według wyników badań *Sacka* i wsp. z roku 1998, w których oceniano u 275 dzieci w wieku od 3 do 17 lat zależność stężenia wielu różnych parametrów układu immunologicznego od wieku dziecka, stężenie neopteryny w surowicy nie zmienia się w sposób znaczący z wiekiem i ma takie same zakresy normy, jak u osób dorosłych. (156).

Millner oznaczył stężenie NPT w surowicy 91 zdrowych dzieci, między 4 a 18 rokiem życia. U 88 z nich stężenie NPT w surowicy wynosiło poniżej 10 nmol/l, a u pozostałej trojki dzieci mieściło się w przedziale 10,1-11,0 nmol/l (40).

Wyznaczenia wartości referencyjnych m.in. stężenia neopteryny w surowicy młodzieży podjął się w swojej pracy *Satoh*. Do badań włączył on grupę 111 osób (48 % stanowiły dziewczęta), w wieku 12-19 lat, dzieląc ją dalej na trzy podgrupy w zależności od

wieku: 12-14 lat, 15-16 lat i 17-19 lat. Nie stwierdzono różnic w stężeniu NPT w surowicy w zależności od wieku, ani od płci. Stężenie neopteryny w surowicy w całej badanej grupie mieściło się w przedziale: 2,2 - 9,1 nmol/l, nieco wyższe wartości osiągając pośród przedstawicieli rasy białej (75% badanych) względem przedstawicieli rasy czarnej (pozostałe 25% badanych) (41).

W roku 1989 *Honlinger* i wsp. opublikowali wyniki badań przeprowadzonych na bardzo licznej grupie osób dorosłych. Zbadano stężenie NPT w surowicy 76587 zdrowych ochotników, dawców krwi, pochodzenia austriackiego, w wieku 17-64 lat. Według tych autorów średnie stężenie neopteryny w surowicy krwi wynosi $5,4 \pm 2,3$ nmol/l i nie zależy od wieku, ani od płci. Wyznaczając zakres wartości referencyjnych metodą podwójnego odchylenia standardowego ustalono wartość graniczną na poziomie 10 nmol/l. Obliczono, że w tak dużej grupie chorych tylko u 1,62% zdrowych osób stężenie NPT przekraczało 10 nmol/l. W całej grupie badanych stężenie neopteryny w surowicy wahało się w zakresie od 0,3 do 50 nmol/l (115).

Zwiększając grupę badanych, uznanych za zdrowych, dawców krwi do 93789 osób, u 1767 (1,88%) stwierdzono stężenie NPT przekraczające wartość graniczną 10 nmol/l (157).

Przyjmując 10 nmol/l jako wartość graniczną stężenia NPT w surowicy *Schennach* stwierdził, że u 4251 osób, co stanowi 7,8% z 54402 badanych dawców krwi, stężenie NPT przekroczyło tę wartość (114).

Podobne wyniki w swoim doniesieniu przytacza *Hammerlinck*. Średnie stężenie neopteryny w surowicy 1837 zdrowych dawców krwi, w wieku 18-67 lat, wynosiło $5,89 \pm 1,78$ nmol/l. Wartość graniczną przyjęto na poziomie 10,5 nmol/l. Poniżej tej wartości znajdowało się 99% uzyskanych wyników (142).

Schennach oznaczając stężenie NPT w surowicy 1156 zdrowych dorosłych dawców krwi uzyskał wyniki mieszczące się w granicach pomiędzy 3,4-19,6 nmol/l. Dodatkowo stwierdził, że 8,1% badanych uzyskało wynik stężenia NPT w surowicy wynoszący powyżej 8,7 nmol/l (wartość ta przyjęta została jako graniczna (39)), a w 2,16% przypadków stężenie NPT przekraczało 11 nmol/l (158).

W prezentowanej pracy własnej stężenie NPT w surowicy wynosiło ponad 11 nmol/l (wyznaczona wartość graniczna) u 5,71% dzieci uznanych wcześniej za zdrowe (grupa kontrolna).

Tabela 39**Wartości referencyjne stężenia neopteryny w surowicy przyjęte przez różnych autorów**

Autor pracy (cyt)	Rok publikacji	Liczba osób badanych	Wiek badanych (lata)	Wyznaczona przez autora wartość graniczna (referencyjna) stężenia NPT w surowicy (nmol/l)
<i>Werner (39)</i>	1987	263	1-18	13,5
<i>Werner (39)</i>	1987	359	19-75	8,7
<i>Werner (39)</i>	1987	40	powyżej 76	19
<i>Millner (40)</i>	1998	91	4-18	10
<i>Honlinger (115)</i>	1989	76587	17-64	10
<i>Schennach (114)</i>	1998	54402	powyżej 18	10
<i>Hammerlinck (142)</i>	1999	1837	18-67	10,5
Własne	2006	105	1 - 18	11

Aby ocenić przydatność kliniczną oznaczania stężenia neopteryny w surowicy jako parametru różnicującego infekcje o etiologii wirusowej i bakteryjnej, w niniejszej pracy zbadano łącznie 127 dzieci z infekcją, w tym 99 dzieci leczonych było z powodu biegunki, a 28 z powodu zakażenia układu moczowego (zum). Warunkiem włączenia dziecka do dalszych badań było ustalenie czynnika etiologicznego wywołującego infekcję.

Czynnikiem etiologicznym w grupie dzieci z biegunką były wirusy (67 dzieci) i bakterie (32 dzieci). Zaobserwowano statystycznie istotne różnice stężenia NPT w surowicy, w zależności od etiologii biegunki. W infekcjach wirusowych stężenie NPT w surowicy osiągało znacznie wyższe wartości niż w infekcjach bakteryjnych. Blisko 90% dzieci z biegunką wirusową miało stężenie NPT w surowicy krwi przekraczające

przyjętą normę 11 nmol/l. W tej podgrupie dzieci, stężenie NPT w surowicy osiągnęło najwyższe wartości spośród wszystkich uzyskanych wyników, sięgając maksymalnie do 171 nmol/l. Nie obserwowano przy tym różnicy wartości stężenia NPT w zależności od rodzaju wirusa (Rotawirusy (RNA) i Adenowirusy (DNA)) wywołującego biegunkę, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy (49,53).

Pośród bakterii wywołujących biegunkę wyhodowano enteropatogenne szczepy E coli (EPEC) (u 22 dzieci) oraz bakterie Salmonella (u 10 dzieci). W tej podgrupie dzieci z biegunką bakteryjną różnice wartości stężenia NPT były bardzo znaczące. U dzieci zakażonych bakterią Salmonella stężenie NPT w surowicy było wysokie i aż u 90 % badanych dzieci powyżej przyjętej normy. U dzieci z biegunką, u których z kału wyhodowano bakterie EPEC, w blisko 90 % przypadków wynik stężenia NPT mieścił się w granicach normy. Różnice te prawdopodobnie wynikają z innego sposobu namnażania się bakterii. Enteropatogenne E coli to bakterie zewnątrzkomórkowe, zaś Salmonella jest bakterią wewnątrzkomórkową i tym samym uruchamia odpowiedź typu komórkowego, co tłumaczy wysokie wartości stężenia NPT.

Dodatkowo porównano wartości stężenia NPT, jakie obserwowano u dzieci z biegunką o etiologii bakteryjnej EPEC i etiologii wirusowej, wyłączając z tej grupy dzieci zakażone bakterią Salmonella. Obserwowano nasilenie statystycznie istotnych różnic wartości stężenia NPT względem porównywanych wcześniej grup dzieci z biegunką bakteryjną i wirusową.

Etiologię zakażeń układu moczowego stanowiły szczepy E coli. Były to infekcje zewnątrzpochodne, nabyte przez zdrowe dotychczas dzieci, bez wad układu moczowego w wywiadzie. Wartości stężenia NPT w surowicy w tej grupie dzieci były porównywalne z wartościami wyników uzyskanych w grupie kontrolnej. Między tymi grupami nie obserwowano również różnicy w częstości występowania stężenia NPT przekraczającego przyjętą normę.

Zakażenia wirusami i bakteriami namnażającymi się wewnątrzkomórkowo wywołują odpowiedź komórkową. W niniejszej pracy porównano stężenie neopteryny w surowicy dzieci z infekcjami, gdzie ten rodzaj odpowiedzi uznaje się za dominujący, ze stężeniem neopteryny w surowicy dzieci, oznaczanym w przebiegu zakażenia bakteriami zewnątrzkomórkowymi. W grupie dzieci, u których w przebiegu infekcji spodziewamy się dominacji odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego stężenia neopteryny były znacząco statystycznie wyższe niż u pozostałych dzieci.

Na podstawie tych wyników można uznać neopterynę jako **nieswoisty parametr różnicujący infekcje wirusowe wraz z zakażeniami bakteriami wewnątrzkomórkowymi od infekcji bakteriami zewnątrzkomórkowymi**.

W monografii dotyczącej neopteryny (20) na pierwszym miejscu listy klinicznych wskazań do oznaczania stężenia neopteryny wymienione są właśnie infekcje. Wysokich stężeń NPT w płynach ustrojowych można spodziewać się przede wszystkim w infekcjach wirusowych. Badanie stężenia neopteryny może służyć w tych infekcjach nie tylko jako parametr **różnicujący**, ale także **monitorujący i prognostyczny**. Potwierdzone zostało to w całym szeregu prac (3,11,20,142,159,160,161).

Denz opisuje ekstremalnie wysokie stężenia neopteryny u wszystkich badanych pacjentów z ostrą infekcją wirusową (zapalenie wątroby typu A, infekcje dróg oddechowych, biegunki), a prawidłowe lub tylko nieznacznie podwyższone u pacjentów z ostrą infekcją bakteryjną (zapalenie płuc) (46).

Okumara w swojej pracy porównywał stężenie NPT w surowicy 34 dzieci, w wieku 1-6 lat (średnia 2,4 roku), gdzie u 17 z nich stwierdzono obecność antygeny wirusa grypy typu A, a pozostałych 17 zdrowych dzieci stanowiło grupę kontrolną. Stężenie NPT u dzieci chorych na grypę było znacząco wyższe i wynosiło $23,8 \pm 1,8$ nmol/l, niż u pozostałych dzieci, u których wynosiło $14,1 \pm 1,8$ nmol/l. Nie stwierdzono różnic w stężeniu NPT w surowicy, związanych z wiekiem, ani z gorączką (162).

Niederwieser, który do swoich badań włączył dzieci z infekcjami o różnej etiologii, wzrost stężenia NPT w moczu obserwował u 14% dzieci z infekcją bakteryjną (zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) i u ponad 90% dzieci z infekcją wirusową (ospa wietrzna, świnka, wirusowe zapalenie gardła). Mimo to, autor podkreśla, że stężenie NPT w surowicy lub moczu jest parametrem nieswoistym i pozwala oceniać jedynie aktywację odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (163).

Stężenie neopteryny w moczu u dzieci oznaczał również *Graessl*. Swoimi badaniami objął 45 dzieci z astmą, 29 dzieci z infekcjami, w których czynnik etiologiczny stanowiły Rotawirusy, 9 dzieci z infekcjami wirusowymi o innej etiologii, 5 dzieci z infekcjami bakteryjnymi i 29 dzieci zdrowych (bez cech infekcji). Stężenie neopteryny w moczu dzieci z astmą było niskie, porównywalne do stężeń NPT w grupie kontrolnej. U wszystkich dzieci z infekcjami obserwowano znacząco wyższe stężenia NPT, przy czym zdecydowanie najwyższe w grupie dzieci, u których ustalono czynnik etiologiczny infekcji w postaci Rotawirusów (164).

W innej pracy opisano, że wśród pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby, aż 96% miało podwyższony poziom neopteryny (48,165).

Innego zdania jest *Shaw*. Po przeprowadzeniu badań stężenia CRP i NPT w surowicy u pacjentów z infekcjami o etiologii bakteryjnej (*Pneumococci*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *E coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Meningococci*) oraz infekcjami wirusowymi (*Hepatitis A*, *CMV*, *EBV*, *Rubella*, *Parvovirus*) stwierdził, że oznaczania stężenia neopteryny nie można uznać za parametr różnicujący pomiędzy badanymi grupami. Opisuje on, że jedynie *ratio* CRP: NPT jest pomocne w diagnostyce różnicowej. Jeśli stosunek stężenia CRP (mg/l) do stężenia NPT (nmol/l) wynosi powyżej 1, przemawia to za infekcją bakteryjną, natomiast wartość poniżej 1 charakterystyczne jest dla infekcji o etiologii wirusowej (47).

W innych dostępnych doniesieniach opisywano, że badane stężenia NPT korelują z przebiegiem klinicznym infekcji wirusowych: cytomegalii (51,53), zapalenia wątroby (48,114), różyczki (49).

Przebieg krzywej wykreślającej stężenie NPT u każdego z tych pacjentów byłby podobny. W okresie inkubacji stężenie NPT rośnie osiągając najwyższą wartość w okresie objawów klinicznych. Następnie dość szybko obniża się i ulega normalizacji w okresie rekonwalescencji, kiedy we krwi pojawiają się neutralizujące dany wirus przeciwciała, w mianie możliwym do oznaczenia (53,157,160).

U dzieci z ospą wietrzną najwyższe stężenie neopteryny obserwowano w momencie, kiedy zaprzestały pojawiać się nowe zmiany wysypkowe na skórze (160).

W przypadku odry, najwyższe stężenia neopteryny stwierdzono 1-3 dni od pojawienia się wysypki. Stężenie NPT wróciło do normy u tych pacjentów po 2-3 tygodniach (50).

Jako parametr prognostyczny neopteryna szeroko opisywana jest u pacjentów zakażonych wirusem HIV (11,57,58,159,160,166). *Chlabicz* opisuje, istnienie dodatniej korelacji wysokich stężeń NPT w płynach ustrojowych z wczesnym występowaniem AIDS, zaś niskich stężeń NPT u pacjentów zakażonych HIV z długotrwałym okresem bezobjawowym (13).

W przeciwieństwie do ostrych infekcji wirusowych, w zakażeniu HIV, stężenie NPT nigdy nie osiąga wartości prawidłowych (159). Mimo powszechnego uznania ogromnej przydatności oznaczania stężenia NPT u pacjentów zakażonych HIV i obserwacji podwyższonego stężenia NPT u wszystkich pacjentów z AIDS, *Niederwieser* opisuje

jednego pacjenta z pełnoobjawowym AIDS i prawidłowymi stężeniami NPT w moczu (163).

W literaturze opisano, iż wzrost stężenia NPT obserwowano także w infekcjach bakteriami wewnątrzkomórkowymi i w infekcjach pasożytniczych (gruźlica płuc u dorosłych (47,68) i dzieci (69), czy malaria (70)).

W dostępnej literaturze nie znaleziono wyników badań stężenia neopteryny w zakażeniu bakterią *Salmonella*. Jest to bakteria namnażająca się wewnątrzkomórkowo (167).

W piśmiennictwie opisywany jest również wzrost stężenia NPT obserwowany w **przewlekłych** infekcjach bakteryjnych (20).

Denz i wsp. obserwowali względnie wysokie stężenia NPT w moczu u pacjentów z infekcją dróg moczowych o charakterze przewlekłym. Dla potwierdzenia tej teorii i wykluczenia lokalnego pochodzenia NPT (miejscowa aktywacja układu immunologicznego) wykonano u tych pacjentów oznaczenia stężenia NPT i interferonu- γ w surowicy, uzyskując również tu podwyższone wartości obydwu tych parametrów (46).

Wzrost stężenia NPT w przewlekłych infekcjach bakteryjnych, jest prawdopodobnie związany z udziałem różnych cytokin, np. IL-1, TNF-alfa, które powodują wzrost stężenia IFN-gamma (159). Niektórzy autorzy wzrost stężenia neopteryny w surowicy chorego w czasie trwania infekcji bakteryjnej wiążą z wystąpieniem powikłań septycznych, co udowodnili oni w swoich badaniach (14,80).

Muller badając pacjentów po przeszczepie serca stwierdził, że oprócz znaczącego wzrostu stężenia NPT u pacjentów, u których nastąpiło odrzucenie przeszczepu, wzrost stężenia NPT obserwowano również w trakcie powikłań, jakimi były infekcje bakteryjne i wirusowe (107).

Są doniesienia, w których opisuje się, że proces zapalny spowodowany przez endotoksyny bakterii Gram-ujemnych, może powodować aktywację limfocytów T i wyzwać produkcję interferonu- γ , przy czym problem ten jest nadal dyskutowany (20,46,168). Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być wyniki, jakie w swojej pracy uzyskał *Bloom* i wsp. U zdrowych ochotników, po dożylnym podaniu endotoksyn, obserwował wzrost stężenia NPT w ciągu 24 godzin (169).

Reasumując, szereg autorów uważa, że ostre zlokalizowane infekcje bakteryjne, niezależnie od etiologii (z wyłączeniem bakterii wewnątrzkomórkowych) nie powodują wzrostu stężenia neopteryny (159). W większości publikacji neopteryna została opisana jako parametr różnicujący ostre infekcje bakteryjne od wirusowych (1,11,20,166). Potwierdzają to również uzyskane wyniki badań własnych.

Dane z piśmiennictwa wskazują na to, że wielokrotnie podejmowano próby badania przydatności klinicznej oznaczania stężenia neopteryny w chorobach o podłożu autoimmunologicznym (20,28,160).

Powszechnie wiadomo, że odpowiedź immunologiczna typu komórkowego ma swój udział w etiopatogenezie tej grupy schorzeń (11).

Stężenie neopteryny badano u chorych z rozpoznaniem: liszaja rumieniowatego układowego (87), reumatoidalnego zapalenia stawów (84), ziarniniaka Wegenera (170), zapalenia skórno- mięśniowego (89,143), przewlekłego nieswoistego zapalenia jelit, takiego jak: choroba Leśniowskiego- Crohna (90,91), czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego (92) czy celiakii (20).

Opisuje się, że stężenie neopteryny jest odzwierciedleniem stopnia aktywności i zaawansowania chorób o podłożu autoimmunologicznym (159).

W ostrym liszaju rumieniowatym układowym analizowano przydatność kliniczną wielu parametrów oznaczanych standardowo, markerów aktywności immunologicznej (przeciwciała przeciw dsDNA, rozpuszczalny receptor IL-2, OB, składowe dopełniacza C3, C4 i produkty rozpadu C3). Najwyżej oceniono równoczesne oznaczanie stężenia NPT i OB, jako parametrów najlepiej korelujących z aktywnością tej choroby (171).

W wymienianych wyżej pracach badano stężenie NPT przede wszystkim u ludzi dorosłych, jedynie w niewielu przypadkach doniesienia dotyczą schorzeń wieku dziecięcego.

Badaniom poddane zostały przykładowo dzieci z celiakią, u których znacząco wyższe stężenia NPT obserwowano w okresie czynnej choroby, a stosowanie diety bezglutenowej prowadziło do systematycznego obniżania stężenia neopteryny w moczu (20).

W wyniku badań prowadzonych pośród dzieci z młodzieńczym zapaleniem skórno-mięśniowym (w wieku 4-17 lat) zaobserwowano, że oznaczanie stężenia NPT w ich moczu dobrze koreluje z aktywnością choroby, funkcją mięśni i pozwala przewidywać dalszy jej przebieg. Nie stwierdzono korelacji stężenia NPT ze stężeniem enzymów: dehydrogenazy mleczanowej (LDH), aminotransferazy asparaginianowej (AST), które u pacjentów z powyższym rozpoznaniem są oznaczane rutynowo (143).

W literaturze światowej istnieje stosunkowo niewiele doniesień odnośnie klinicznej przydatności oznaczania stężenia neopteryny w przewlekłych **nieswoistych zapaleniach jelit (nzj)**.

Badania wykonywano przede wszystkim u ludzi dorosłych (90,91,172) i tylko w jednym przypadku doniesienie dotyczy dzieci z chorobą Crohna (173). We większości tych prac oznaczano stężenie neopteryny w moczu (90,91,174). Istnieją tylko pojedyncze doniesienia na temat oznaczania stężenia neopteryny w surowicy osób z nieswoistymi zapaleniami jelit (170,175,176). W literaturze polskiej nie znaleziono ani jednej publikacji na ten temat.

Według piśmiennictwa, u większości pacjentów z aktywną postacią przewlekłego nieswoistego zapalenia jelit (choroba Leśniowskiego- Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego) obserwuje się podwyższone stężenie neopteryny.

Niemal wszyscy autorzy, którzy mimo opisywanych dodatnich korelacji stężenia neopteryny w płynach ustrojowych z aktywnością choroby Leśniowskiego- Crohna czy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, bardzo podkreślają brak swoistości tego markera i uważają, że wskazane jest monitorowanie stężenia neopteryny równoległe do obserwacji całego szeregu innych parametrów laboratoryjnych i klinicznych (177).

Brak różnic w stężeniu neopteryny w surowicy u osób z nieswoistymi zapaleniami jelit a grupą kontrolną opisuje *Forrest*. Trzeba jednak zauważyć, że grupy poddane badaniom w tym projekcie są mało liczne (5 pacjentów z chorobą Crohna i 7 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego), i niemal wszyscy pacjenci, oprócz jednego, byli w okresie remisji (172).

Innych obserwacji dokonał *Propst*. Obejmując badaniami grupę 80 pacjentów z nzj (choroba Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego) zauważył istnienie dodatkowej korelacji między stężeniem neopteryny w surowicy, białka C-reaktywnego, alfa-1-

glikoproteiny i antagonisty receptora IL-1 u pacjentów z chorobą Crohna. Dodatkowo parametry te korelowały ze stopniem aktywności choroby, czego zupełnie nie obserwowano u pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, którzy również byli objęci badaniami. Uzyskane wyniki uzasadniono inną etiopatogenezą obu opisanych typów nieswoistych zapaleń jelit (176).

Przeprowadzone badania własne dotyczyły 82 dzieci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit, w tym z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego- Crohna było 34 dzieci, z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego 48 dzieci. Stężenie NPT w surowicy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit było znamienne statystycznie wyższe niż u dzieci z grupy kontrolnej, u blisko 30% dzieci przekraczało punkt odcięcia (wartość graniczną) przyjęty na poziomie 11 nmol/l. Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie w stężeniach NPT pomiędzy pacjentami z różnymi postaciami nieswoistych zapaleń jelit: chorobą Leśniowskiego- Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Mimo to, warto podkreślić, że u chorych z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego- Crohna, obserwowano wyższe średnie stężenia NPT w surowicy $9,72 \pm 6,08$ nmol/l, niż we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego ($8,76 \pm 5,57$ nmol/l). Wyższe u dzieci z rozpoznaniem choroby L-C były również wartości maksymalne stężenia NPT, jak również więcej dzieci miało wyniki stężenia NPT przekraczające wartość graniczną 11 nmol/l.

W całej badanej grupie dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit zaobserwowano brak korelacji stężenia NPT w surowicy ze stężeniem prokalcytoniny.

Publikowane również przez innych autorów wyniki badań dotyczące oznaczania prokalcytoniny wykazały brak przydatności tego testu w diagnostyce i monitorowaniu chorób o podłożu autoimmunizacyjnym (178). Podobnie jak w pracy cytowanej, tak i we własnej, u zdecydowanej większości pacjentów z niej stężenie PCT pozostaje w normie. Tylko u 4 dzieci z grupy 82 badanych (tj. 0,05%) z nieswoistymi zapaleniami jelit stężenie PCT przekroczyło normę (powyżej 0,5 ng/ml), w tym u 1 dziecka otrzymano wynik powyżej 5 ng/ml.

Według dostępnej literatury obserwowano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem NPT w moczu lub surowicy, a stopniem aktywności choroby u pacjentów z **chorobą Leśniowskiego- Crohna**, mierzonej przy pomocy skali CDAI (*Crohn's*

disease activity index). Wiadomym jest, że chorobę tę charakteryzuje przebieg z obecnością zaostrzeń i remisji. W czasie największej aktywności choroby obserwowano najwyższe stężenia NPT w surowicy (175) i w moczu (91).

W pracy własnej zbadano stężenie NPT w surowicy 34 dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna, o jej różnym stopniu aktywności. Uzyskane wyniki wynosiły od 3,250 do 31,432 nmol/l (średnio $9,718 \pm 6,079$ [SD] nmol/l, mediana 7,621) i były statystycznie wyższe niż u dzieci z grupy kontrolnej. U niemal 40% dzieci stężenie NPT w surowicy przekraczało punkt odcięcia (wartość graniczną) przyjęty dla wszystkich dzieci na poziomie 11 nmol/l. Obserwowano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem NPT w surowicy, a stopniem aktywności choroby. W czasie największej aktywności choroby obserwowano najwyższe stężenia NPT w surowicy.

Podobne wyniki badań publikuje w swojej pracy *Duclos*, który oznaczał stężenie neopteryny w surowicy osób z chorobą Crohna. Badaniami objętych zostało 65 dorosłych pacjentów, z różnym stopniem aktywności choroby. Zauważono, że stężenie NPT w surowicy osiąga wyższe wartości adekwatnie do stopnia aktywności choroby. Dodatkowo opisano dodatnią korelację stężenia NPT w surowicy z rozpuszczalnym w surowicy receptorem dla interleukiny-2 (SR-IL-2), który również opisywany jest parametr korelujący z aktywnością chorób o podłożu autoimmunologicznym (175).

Związek pomiędzy stężeniem neopteryny w moczu a stopniem aktywności klinicznej w chorobie Crohna u dzieci i młodzieży opisuje także *Granditsch*. W publikowanej pracy wykonanych zostało 135 oznaczeń u dzieci w wieku od 9 do 19 lat. Autor wyróżnia neopterynę, spośród panelu 23 danych/parametrów pochodzących z zebranego wywiadu, badania klinicznego i testów laboratoryjnych, jako niezależny, ściśle korelujący z przebiegiem, wskaźnik aktywności tej choroby (173).

Reibnegger, który oznaczał stężenie NPT w moczu dorosłych z chorobą Crohna, dokonał analizy 15 różnych objawów klinicznych i parametrów laboratoryjnych badanych u tych pacjentów. Za najbardziej przydatne do oceny aktywności choroby uznał oznaczanie: hematokrytu, ilości płynnych stolców oddawanych w czasie jednego tygodnia oraz stężenia NPT w moczu. Następnie opisane wyżej trzy parametry

porównał z powszechnie stosowaną skalą CDAI, w której bierze się pod uwagę osiem parametrów i ustalił, że uzyskane wyniki są porównywalne. W ocenie długofalowej, kiedy każdego pacjenta badano kilkakrotnie, utworzona „nowa skala” wydawała się nawet nieco lepiej oddawać stopień aktywności choroby niż skala CDAI (91).

Jako całkowicie niezależny wskaźnik aktywności klinicznej choroby Crohna opisuje stężenie neopteryny w moczu w swojej pracy *Judmaier*, który objął swoimi badaniami 76 pacjentów z tym schorzeniem (174).

Dużą przydatność oznaczania stężenia NPT w moczu u pacjentów z chorobą Crohna podkreśla również *Prior*. Opisuje on ścisłą korelację stężenia NPT z czasem trwania choroby, masą ciała i obecnością wyczuwalnego w badaniu palpacyjnym guza jamy brzusznej. Według opinii tego autora, biorąc pod uwagę hematokryt, ilość stolców oddawanych w czasie tygodnia, wyczuwalny guz - lepiej ocenimy aktywność choroby niż stosując skalę CDAI. *Prior* uważa również, że lokalizacja i rozmiar zmian chorobowych nie mają wpływu na zmianę stężenia NPT, natomiast zastosowanie właściwego leczenia zachowawczego lub chirurgicznego prowadzi do systematycznego, liniowego spadku wartości NPT (90).

Według najnowszych doniesień dotyczących nowoczesnych metod leczenia choroby Leśniowskiego- Crohna neopteryna może jednak nie sprawdzać się w roli czynnika monitorującego leczenie. Przeprowadzono obserwacje dotyczące zmian parametrów układu immunologicznego u osób z chorobą Crohna w przebiegu leczenia rekombinowaną ludzką interleukiną 10 (rHuIL-10), uznawaną za cytokinę przeciwzapalną. Została ona wprowadzona w ostatnich latach eksperymentalnie do leczenia immunomodulującego w nżj, przy założeniu, że hamuje ona wytwarzanie cytokin pochodzących z limfocytów Th1 (takich jak: INF- γ i IL-2), a także przeciwdziała wielu skutkom działania INF- γ (179). Po przeprowadzeniu badań okazało się, że wysokie dawki (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) IL-10 silnie pobudzają produkcję IFN- γ przez obwodowe limfocyty, w efekcie czego obserwowano również wzrost stężenia NPT w surowicy tych pacjentów, zamiast oczekiwanego spadku (179).

Wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy badań są zbliżone do wyników publikowanych przez innych autorów. Ocena stężenia neopteryny może być

przydatnym parametrem w monitorowaniu aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna, przy czym należy jeszcze raz zdecydowanie podkreślić, że nie jest to wskaźnik swoisty (90,91). Obserwacje dotyczące stężenia NPT przyczyniły się do bliższego poznania etiopatogenezy tej choroby, potwierdzenia udziału w niej odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego.

We **wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego** również znaleziono istnienie silnej korelacji pomiędzy stężeniem neopteryny a aktywnością choroby. Oceniono, że oznaczanie stężenia NPT jest szczególnie przydatne w długofalowym monitorowaniu przebiegu choroby.

Niederwieser w swojej pracy obserwował podwyższone stężenie NPT w moczu dorosłych z rozpoznaniem wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego u 100% pacjentów z ciężką postacią choroby, 75% osób z umiarkowaną i u żadnego z pacjentów z łagodną postacią choroby (wg skali Trullove- Wittsa). Analizowano przydatność oznaczania stężenia NPT w odniesieniu do powszechnie badanych parametrów klinicznych, takich jak: hemoglobina, ilość stolców oddanych w ciągu doby, temperatura, szybkość opadania krwinek czerwonych, obszar zajętego jelita. Oceniono korelację poszczególnych wymienionych parametrów z aktywnością kliniczną choroby klasyfikowaną w skali Trullove- Wittsa. Najsilniejszą korelację w tym zakresie obserwowano w odniesieniu do rozmiaru obszaru zajętego jelita, a tylko nieco słabszą wykazano wobec stężenia NPT w moczu. Słabiej z aktywnością choroby korelowały: szybkość opadania krwinek czerwonych, ilość stolców oddawanych na dobę, a najslabiej: temperatura, stężenie hemoglobiny (92).

W prezentowanej pracy własnej częstość wyników dodatnich stężenia NPT (powyżej punktu odcięcia na poziomie 11 nmol/l) u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wynosiła 3,33% z łagodną postacią choroby, 33,3% ze średnim stopniem aktywności i 83,33% z ciężkim. Obserwowano statystycznie istotną korelację występowania wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy względem stopnia aktywności choroby.

Obserwowano także istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem NPT a stopniem aktywności choroby ocenianej w skali Truelova- Wittsa.

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) to najczęstsza zapalna układowa choroba tkanki łącznej w wieku rozwojowym. Patogeneza oparta jest na zaburzeniach immunologicznych, które powstają na skutek wystąpienia załamania tolerancji układu immunologicznego względem własnych antygenów. Układ odpornościowy rozpoczyna działanie przeciwko komórkom, tkankom, narządom własnego organizmu. Zarówno w przypadku MIZS, jak i RZS, nie zostały dotychczas do końca poznane mechanizmy prowadzące do przerwania tej tolerancji, najczęściej brane są pod uwagę czynniki infekcyjne, środowiskowe, genetyczne.

Mimo wielu podobieństw w patogenezie obu wymienionych chorób, ich przebieg kliniczny dość znacznie różni się od siebie. W młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów częściej obserwuje się uogólnienie procesu chorobowego. Zdecydowanie rzadziej niż u dorosłych, w MIZS stwierdzona zostaje w surowicy obecność czynnika reumatoidalnego klasy IgM. Według najnowszych danych ocenia się, że występuje on u od 4 do 35% ogółu chorych na MIZS (180).

Od lat prowadzone są na całym świecie badania, które mają na celu znalezienie nowych, bardziej specyficznych markerów serologicznych wymienionych chorób, a także innych parametrów, pozwalających monitorować przebieg choroby i skuteczność leczenia.

Jednym z takich parametrów współcześnie opisywanych jako monitorujących przebieg chorób o podłożu autoimmunologicznym wydaje się być stężenie neopteryny.

Nie znaleziono do tej pory żadnej publikacji na temat badania stężenia neopteryny u dzieci lub młodzieży z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, zarówno w piśmiennictwie polskim, jak i zagranicznym.

W przeprowadzonych badaniach własnych u 67 dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów częstość wyników dodatnich stężenia neopteryny w surowicy wynosiła blisko 30%. Były to dzieci bez cech infekcji, hospitalizowane z powodu choroby zasadniczej.

Wartości stężenia NPT w tej grupie chorych były znacząco wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie NPT u chorych z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów wahało się od 2,8 do 22,8 nmol/l. Nie stwierdzono różnic w stężeniu NPT w zależności od typu początku choroby (uogólniony, wielostawowy, skąpostawowy).

Istniały natomiast istotne statystycznie różnice stężenia neopteryny w zależności od aktywności procesu chorobowego, czyli remisji lub zaostrzenia przebiegu klinicznego choroby. Najwyższe stężenie NPT w surowicy w czasie remisji wynosiło 10,66 nmol/l, a w czasie zaostrzenia sięgało do 22,76 nmol/l. Jak widać w okresie remisji u żadnego z badanych pacjentów (27 dzieci) stężenie NPT w surowicy nie przekroczyło progu odcięcia (*cut-off*), który został przyjęty na poziomie 11 nmol/l. Pośród 40 dzieci, u których badano stężenie NPT w czasie zaostrzenia choroby, próg odcięcia został przekroczony w połowie przypadków (u 50% dzieci).

Nie obserwowano korelacji stężenia NPT z żadnym z innych oznaczanych w tej pracy parametrów (OB, leukocyty, CRP, PCT).

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy chorych z rozpoznaniem młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów wydaje się być parametrem przydatnym w monitorowaniu przebiegu choroby.

Istnieją doniesienia, w których opisuje się bardzo dużą przydatność oznaczania stężenia neopteryny u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (84,181,182).

Stężenie NPT u tych pacjentów oznaczano w surowicy, moczu, a także płynie stawowym, co jest szczególnie przydatne w chorobach reumatycznych.

Jak podkreśla wielu badaczy wykonanie oznaczeń stężenia NPT w moczu pozwala metodą bezinwazyjną monitorować przebieg choroby.

Altindag badając chorych z RZS w okresie zaostrzenia i remisji opisuje ścisłą zależność stężenia NPT od stopnia aktywności choroby. Stwierdził on również występowanie ściśle dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem NPT w moczu pacjentów z RZS a stopniem zaawansowania choroby. Jako zdecydowanie mniej przydatne klinicznie u tych pacjentów ocenia ten autor oznaczanie OB i CRP, zwracając uwagę na brak ich korelacji ze stężeniem NPT (181).

Podobne poglądy wyraża w swojej pracy *Reibnegger*, który opisuje znacząco wyższe stężenia neopteryny w moczu pacjentów z rozpoznaniem RZS, obserwując również korelację: im większy stopień zaawansowania choroby, tym wyższe stężenia NPT. Korelacja ta dotyczy głównie stanu klinicznego pacjenta, ale również zaawansowania zmian radiologicznych obserwowanych w RZS. Długofalowe badania pacjentów z RZS

pozwołyły zaobserwować stosunkowo szybkie zmiany stężenia NPT w zależności od zaostrzenia bądź remisji klinicznej choroby. Również włączenie leczenia powodowało zmiany w stężeniu NPT. Stąd oznaczanie NPT w moczu według tego autora może być przydatne w monitorowaniu leczenia RZS.

Reibnegger analizował także przydatność wielu innych parametrów surowicy (OB, hemoglobina, leukocyty, CRP, czynnik reumatoidalny) w monitorowaniu RZS i udowodnił, że stężenie neopteryny w moczu najlepiej korelowało z przebiegiem klinicznym choroby. Korelacja stężenia NPT z pozostałymi oznaczanymi parametrami była statystycznie słaba. Opisuje on bardzo słabą korelację stężenia NPT z OB i stężeniem hemoglobiny, brak korelacji między stężeniem NPT a ilością leukocytów. Autor wnioskuję, iż oznaczanie samej NPT wnosi tyle samo informacji o chorobie, jak łączne oznaczanie NPT, CRP, OB.

Stężenia neopteryny w moczu osób z zapaleniem kości nie różniły się statystycznie od wartości stężenia NPT oznaczonych w moczu osób zdrowych (grupa kontrolna), natomiast już w I stopniu aktywności RZS były one znacząco wyższe (84).

Wyniki badań dotyczących stężenia neopteryny w surowicy pacjentów chorych na RZS w swojej pracy publikuje *Schroecksadel*. Stwierdził on istnienie dodatniej korelacji stężenia NPT w surowicy ze stopniem zaawansowania choroby. Mimo, iż białko C-reaktywne i szybkość opadania krwinek czerwonych (OB), w ocenie tego autora, dość dobrze obrazują stopień aktywności choroby, stężenie neopteryny ściślej koreluje z okresem choroby (I-IV) w radiologicznej kwalifikacji zmian zachodzących w RZS wg *Steinbrockera*. Podobnie wysoko ocenia autor przydatność oznaczania autoprzeciwciał (przeciwjądrowych- ANA, przeciwkeratynowych- AKA, przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi- CCP), jednak dotyczy to tylko pacjentów w starszym wieku, co zostało w tej pracy szczególnie podkreślone (182).

Szczególnie przydatne jest oznaczanie stężenia NPT w płynie stawowym.

Stężenie neopteryny w płynie stawowym badano w pracy *Krause* i wsp u pacjentów dorosłych z różnymi chorobami przebiegającymi z zajęciem stawów (RZS, zapalenie kości i stawów, dna moczanowa). Autorzy zaobserwowali znacząco wyższe stężenia NPT u osób z rozpoznaniem RZS. Dodatkowo oceniono, że stężenie NPT w płynie stawowym lepiej koresponduje z uogólnioną aktywnością choroby, niż ze zmianami toczącymi się miejscowo, w stawie kolanowym (183).

Najwyższe stężenia NPT w płynie stawowym obserwowano u pacjentów z RZS w czasie zaostrzenia choroby (85), kiedy wyraźnie przewyższały stężenie NPT w surowicy (jako normę stężenia NPT w płynie stawowym przyjmuje się wartości poniżej 9 nmol/l).

W przeszłości wiązano nadzieje z oznaczaniem prokalcytoniny w surowicy osób z chorobą o położu autoimmunologicznym. Jednak oznaczanie stężenia PCT okazało się być nieprzydatne w monitorowaniu przebiegu tych chorób, w tym także chorób reumatologicznych (178).

W przeprowadzonych badaniach własnych stężenie PCT u żadnego z 67 pacjentów z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, niezależnie od postaci i aktywności procesu chorobowego, nie przekroczyło normy.

W prezentowanej przez *Eberharda* pracy stężenie PCT we wszystkich badanych przez niego 226 próbkach krwi pochodzących od dorosłych pacjentów z chorobą reumatologiczną było w normie. Wyżej oceniono przydatność oznaczania stężenia CRP, IL-6 i NPT w tej grupie chorych. Podwyższone powyżej normy stężenie NPT obserwowano w blisko połowie wykonanych badań. Nie obserwowano zmian wartości stężenia NPT w przebiegu uogólnionej infekcji (w zdecydowanej większości przypadków o etiologii bakteryjnej), jaką przebyli opisani chorzy (184).

Kolejnym celem niniejszej pracy była ocena przydatności diagnostycznej oznaczania stężenia neopteryny w surowicy krwi łącznie z innymi wykładnikami procesu zapalnego, głównie białka C-reaktywnego i prokalcytoniny.

Białko C-reaktywne (CRP) odgrywa istotną rolę we wrodzonych zdolnościach obronnych organizmu, skierowanych przeciw drobnoustrojom, przede wszystkim bakteriom. Produkowane jest w wątrobie, w odpowiedzi na uwalniane przez aktywowane makrofagi i komórki NK (naturalne komórki cytotoksyczne) cytokiny. CRP wiąże się z bakterią, a następnie aktywuje dopełniacz drogą alternatywną, biorąc udział w procesie opsonizacji. Oprócz funkcji obronnej, białka ostrej fazy odgrywają rolę w ograniczaniu uszkodzeń tkanek spowodowanych infekcjami, urazami i innymi schorzeniami (choroby nowotworowe, reumatoidalne zapalenie stawów), a także biorą udział w procesach naprawczych tkanek (133).

Białko C-reaktywne, powszechnie oznaczane w codziennej praktyce medycznej, choć jest parametrem nieswoistym, uznaje się za bardzo przydatne w diagnostyce infekcji bakteryjnych (178).

Prokalcytonina (PCT) jest w warunkach fizjologicznych w bardzo niewielkiej ilości jest uwalniana do krwioobiegu. Ulega proteolizie w komórkach parafolikularnych C tarczycy, w wyniku czego powstają mniejsze peptydy: kalcytonina, N-prokalcytonina, katakalcytonina. W przebiegu reakcji zapalnej obserwuje się wzrost stężenia PCT w surowicy krwi, przy czym jej biologiczna rola nie została dotychczas wyjaśniona. Na podstawie wielu przeprowadzonych w ostatnich latach badań i doświadczeń ustalono, że głównym źródłem PCT jest wówczas wątroba, a czynnikiem wywołującym wzrost stężenia PCT we krwi są przede wszystkim **endotoksyny bakteryjne**. Najwyższe wartości stężenia prokalcytoniny obserwuje się w uogólnionych zakażeniach bakteryjnych. Badanie to jest stosowane w diagnostyce różnicowej infekcji bakteryjnych i infekcji wywołanych przez pozostałe patogeny (159,178).

W wykonanych badaniach własnych obserwowano statystycznie istotną dodatnią korelację stężenia NPT w surowicy i białka C-reaktywnego jedynie w grupie dzieci z NZJ. W pozostałych grupach dzieci korelacja stężeń NPT-CRP nie występowała.

Obserwowano poza tym wystąpienie słabej ujemnej korelacji stężenia NPT w surowicy i stężenia PCT w grupie dzieci z biegunką, a w pozostałych grupach korelacji stężenia NPT-PCT nie obserwowano. Podobne wyniki opisują inni autorzy, co tłumaczą innym źródłem pochodzenia w organizmie człowieka obu tych wskaźników (185).

Uznając białko C-reaktywne oraz prokalcytoninę jako parametry, ulegające podwyższeniu w infekcjach o **etiologii bakteryjnej** oraz analizując wyniki przeprowadzonych w pracy badań, można uznać kliniczną przydatność kolejnego nieswoistego parametru, jakim jest neopteryna, której wzrost stężenia obserwujemy przede wszystkim w **infekcjach wirusowych**. Równoczesne oznaczanie wymienionych wyżej trzech parametrów, może ułatwić lekarzowi ustalenie prawdopodobnej etiologii infekcji, a w konsekwencji podjęcie decyzji dotyczącej właściwego leczenia.

Postępowanie takie jest zgodne ze współczesnymi opiniami, gdzie uznaje się, że równoległe wykonanie u pacjenta powyżej opisanych badań jest jak najbardziej uzasadnione, zwłaszcza w diagnostyce różnicowej infekcji (1,2,159).

6. WNIOSKI:

1. Określone w niniejszej pracy wartości referencyjne stężenia neopteryny w surowicy krwi dzieci wynoszą poniżej 11 nmol/l i nie zależą od wieku, ani od płci dziecka.
2. Neopteryna jest parametrem pozwalającym różnicować infekcje o etiologii wirusowej od infekcji bakteryjnych.
3. Oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy może być przydatne klinicznie jako parametr monitorujący aktywność procesów immunologicznych w takich schorzeniach jak: przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów.
4. Oznaczenie stężenia neopteryny w surowicy krwi, jako parametru niezależnego od innych wykładników procesu zapalnego, może stanowić uzupełnienie w diagnostyce stanów zapalnych u dzieci.

7. ANEKS

Klasyfikacja młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (ILAR- Międzynarodowa Liga do Walki z Reumatyzmem, Durban, 1997), (178)

1. Zapalenie stawów o początku uogólnionym
1. Zapalenie stawów z zajęciem niewielu stawów
 - a. przetrwałe
 - b. rozszerzające się
2. Zapalenie wielostawowe
 - a. z brakiem czynnika reumatoidalnego
 - b. z obecnością czynnika reumatoidalnego
3. Łuszczycowe zapalenie stawów
4. Zapalenie stawów z zapaleniem przyczepów ścięgien
5. Inne zapalenia stawów
 - a. nie spełniające kryteriów ww. rozpoznań
 - b. posiadające cechy więcej niż jednego rozpoznania

Tabela 3

Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w poszczególnych przedziałach wiekowych

Wiek dzieci (w latach)	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmo/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
poniżej 5	43	5,781	4,908	2,872	14,779	2,746
od 5 do 10	26	5,287	4,867	3,128	10,716	1,963
powyżej 10	36	5,235	4,239	3,200	13,980	2,795

Tabela 4**Zależność stężenia NPT w surowicy od płci dzieci w grupie kontrolnej**

Płeć	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
Żeńska	47	5,314	4,592	2,872	14,779	2,610
Męska	58	5,599	4,798	3,200	13,882	2,575

Tabela 7**Rozkład wieku w całości grupy dzieci chorych**

Wiek dzieci w latach (x)	Liczba dzieci	Procent
0,0<x<=1,0	39	14,1
1,0<x<=2,0	42	15,2
2,0<x<=3,0	18	6,5
3,0<x<=4,0	8	2,9
4,0<x<=5,0	4	1,4
5,0<x<=6,0	9	3,3
6,0<x<=7,0	8	2,9
7,0<x<=8,0	7	2,5
8,0<x<=9,0	6	2,2
9,0<x<=10,0	3	1,1
10,0<x<=11,0	1	0,4
11,0<x<=12,0	6	2,2
12,0<x<=13,0	19	6,9
13,0<x<=14,0	10	3,6
14,0<x<=15,0	23	8,3
15,0<x<=16,0	21	7,6
16,0<x<=17,0	31	11,2
17,0<x<=18,0	21	7,6
Razem	276	100,0

Tabela 8

Wartości stężenia NPT w surowicy u dzieci w poszczególnych grupach, wg ustalonego rozpoznania

Grupy	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
BIEGUNKI	99	26,614	19,712	3,187	171,033	27,722
ZUM	28	6,685	4,717	3,158	17,256	3,884
NZJ	82	9,160	7,032	3,250	31,432	5,769
MIZS	67	8,339	6,044	2,811	22,765	4,724

Tabela 10

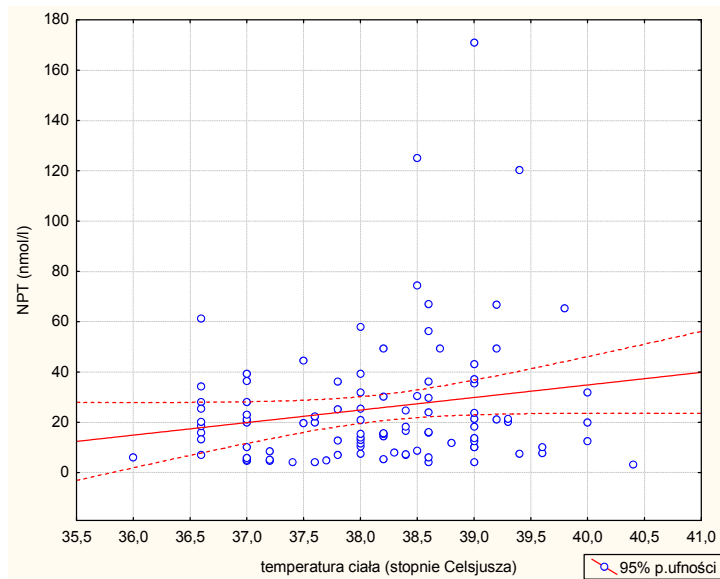
Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie 2: BIEGUNKI w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
BIEGUNKI	99	26,614	19,712	3,187	171,033	27,722

Tabela 11

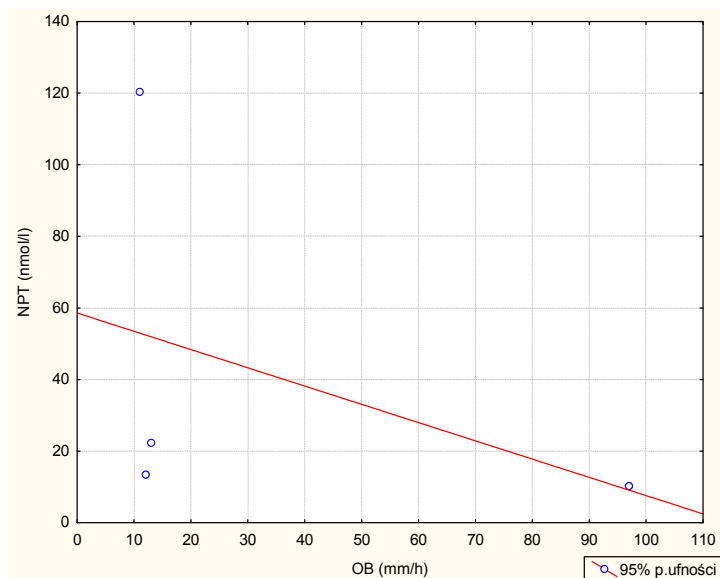
Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy w grupie 2: BIEGUNKI w porównaniu do grupy kontrolnej

GRUPA	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
BIEGUNKI	29 (29,29%)	70 (70,71%)	99
Ogółem dzieci	128	76	204



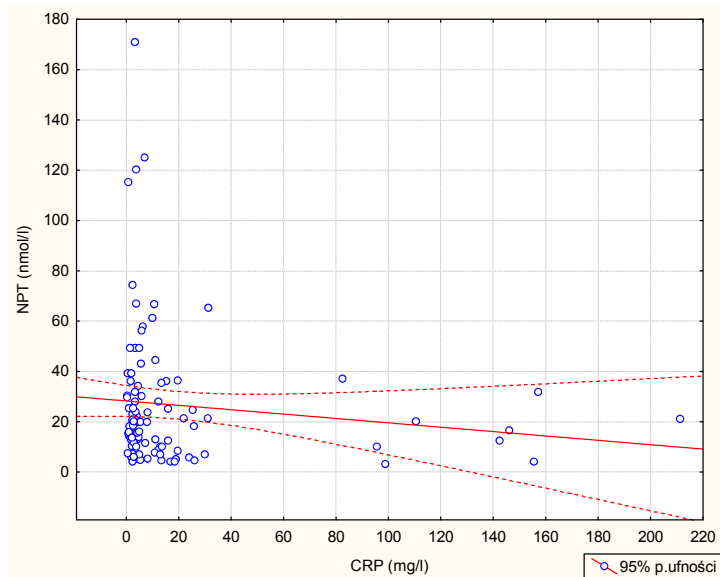
Rycina 17

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w grupie 2: BIEGUNKI



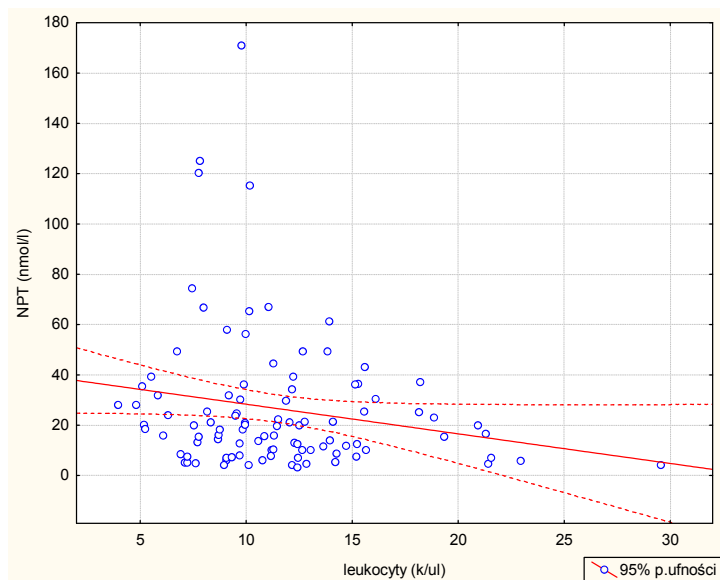
Rycina 18

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w grupie 2: BIEGUNKI



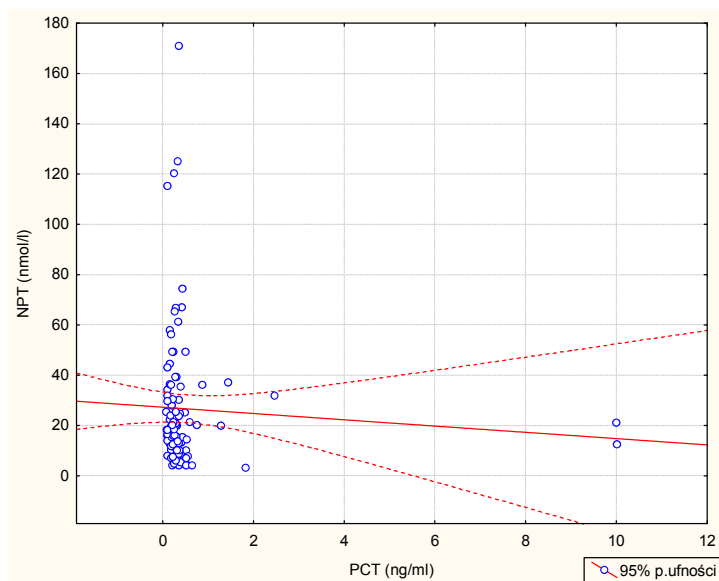
Rycina 19

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w grupie 2: BIEGUNKI



Rycina 20

Zależność stężenia NPT w surowicy od liczby leukocytów w grupie 2: BIEGUNKI



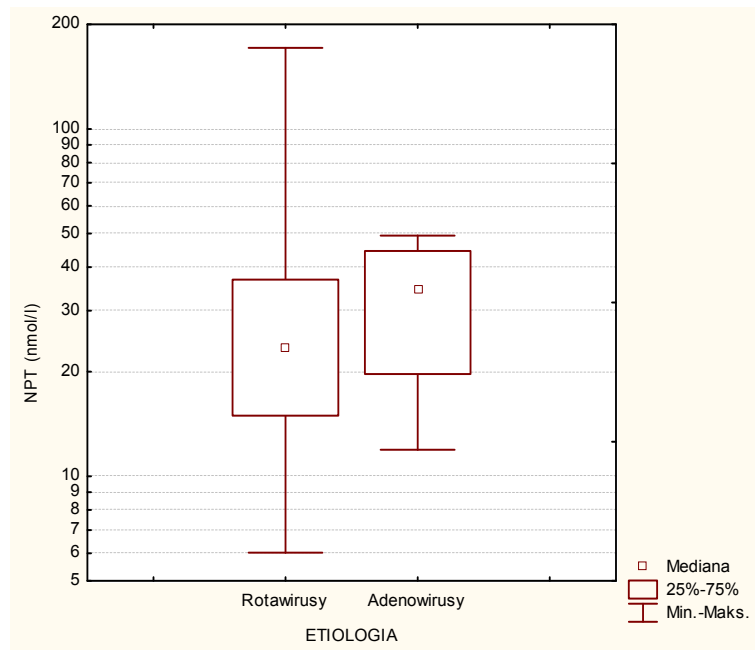
Rycina 21

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości PCT w grupie 2: BIEGUNKI

Tabela 14

Wartość stężenia NPT w surowicy w zależności od rodzaju bakterii, jako czynnika etiologicznego biegunki

Etiologia bakteryjna biegunki	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
EPEC gr C	22	7,326	6,414	3,187	16,693	3,528
Salmonella gr D	10	23,675	20,723	4,805	61,291	15,031



Rycina 24

Wartość stężenia NPT w surowicy dzieci z biegunką wirusową, w zależności od rodzaju wirusa, jako czynnika etiologicznego biegunki

Tabela 18

Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy u dzieci z biegunką, zakażonych bakteriami EPEC i wirusami

Stężenie NPT (nmol/l)	Liczba dzieci z biegunką o etiologii		Liczba dzieci (łącznie)
	bakterie EPEC	wirusowe	
poniżej 11	19 (67,86%)	9 (32,14%)	28
powyżej 11	3 (4,92%)	58 (95,08%)	61
Ogółem dzieci	22	67	89

Tabela 19

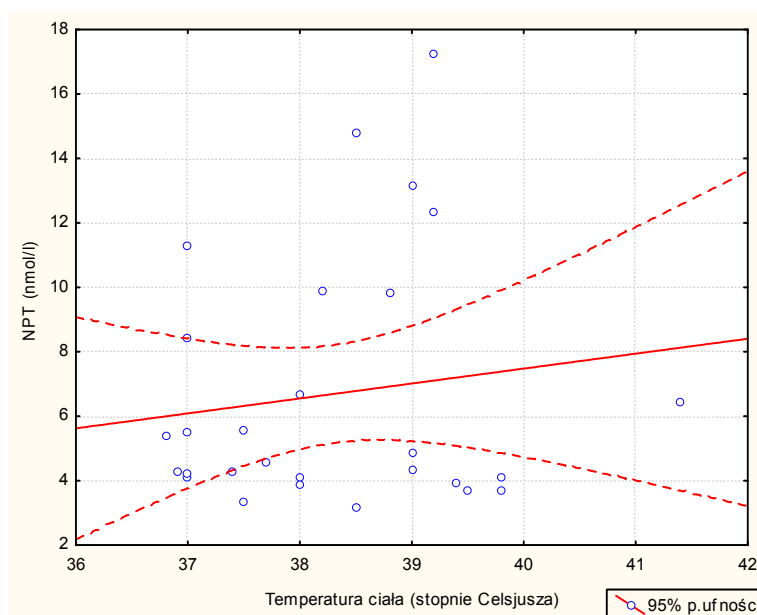
Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie 3: ZUM w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
ZUM	28	6,685	4,717	3,158	17,256	3,884

Tabela 20

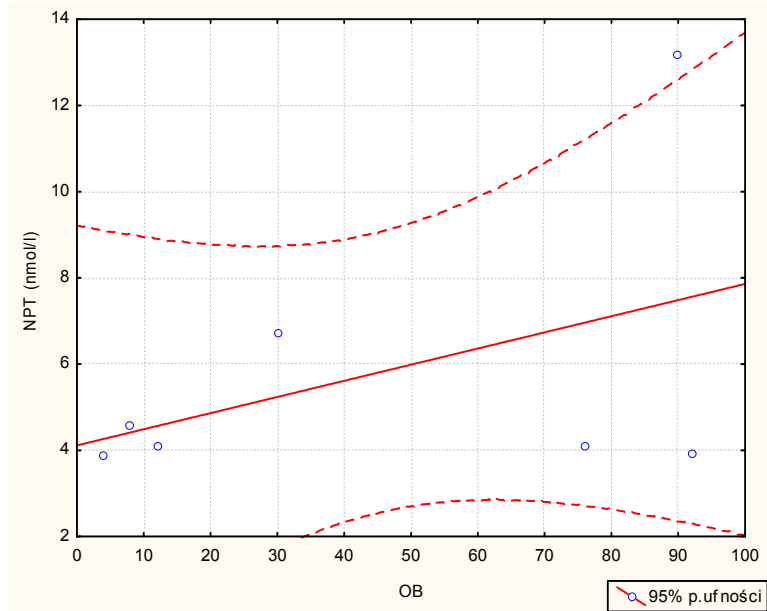
Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie 3: ZUM

GRUPA	Stężenie NPT (nmol/l)		Liczba dzieci
	poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
ZUM	23 (82,14%)	5 (17,86%)	28
Ogółem dzieci	122	11	133



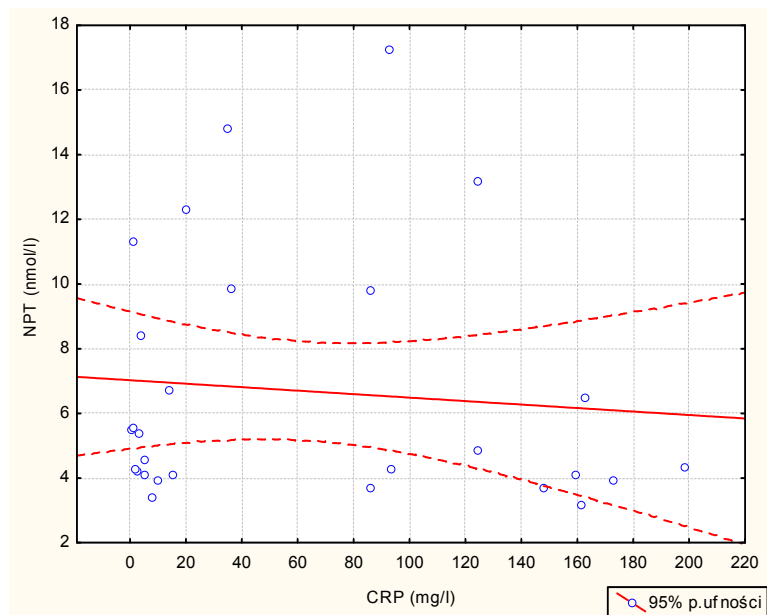
Rycina 27

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w grupie 3: ZUM



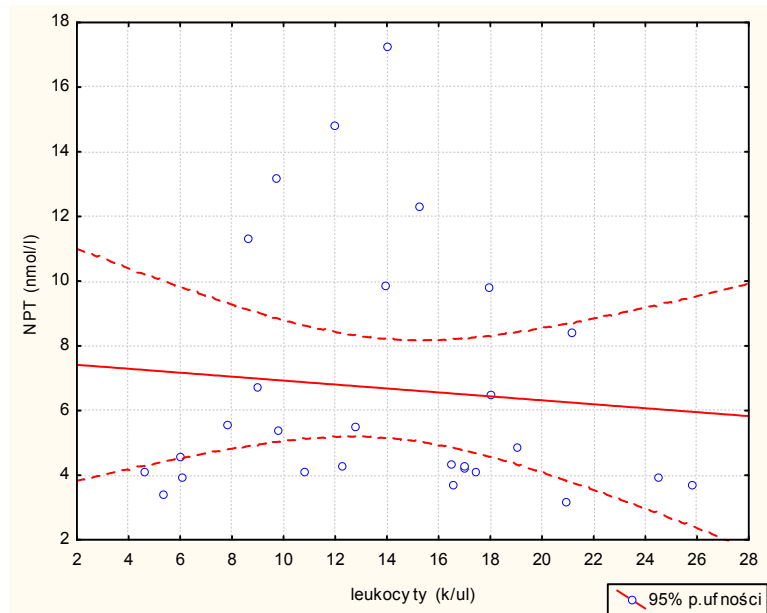
Rycina 28

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w grupie 3: ZUM



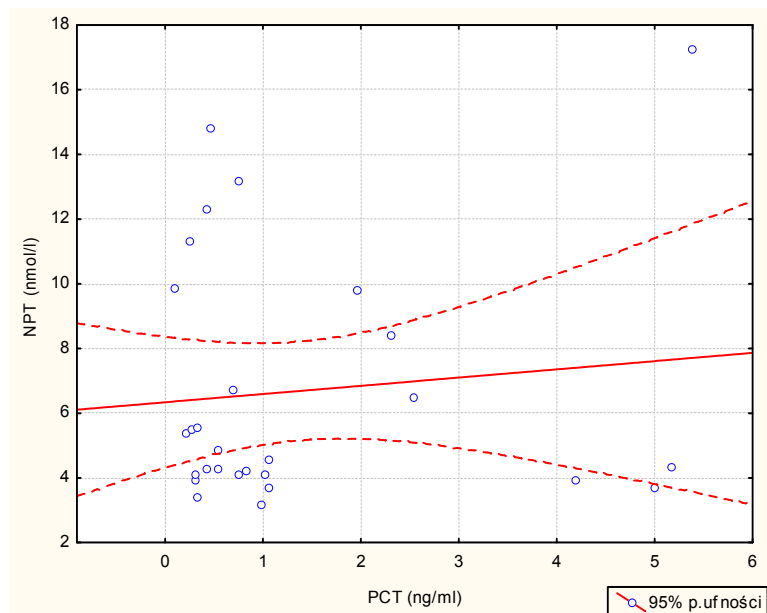
Rycina 29

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w grupie 3: ZUM



Rycina 30

Zależność stężenia NPT w surowicy od liczby leukocytów w grupie 3: ZUM



Rycina 31

Zależność stężenia NPT w surowicy od PCT w grupie 3: ZUM

Tabela 21

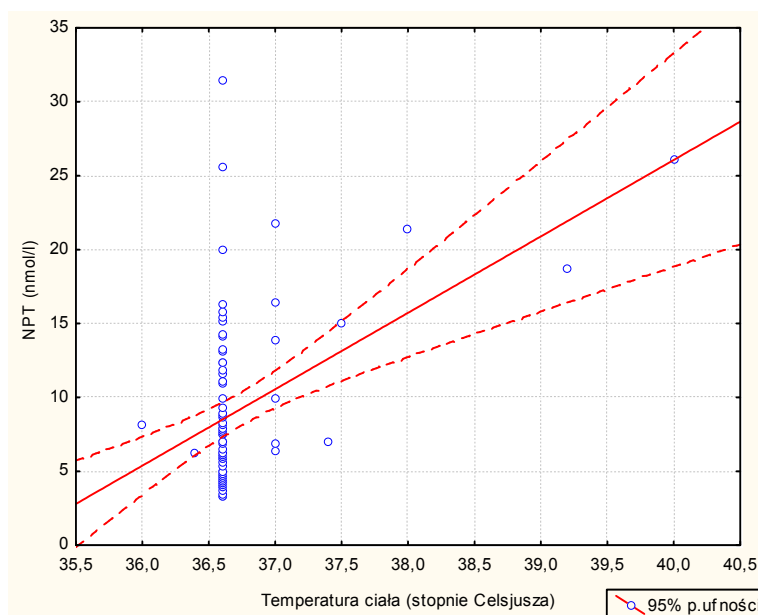
Wartości stężenia NPT w surowicy dzieci w grupie NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
NZJ	82	9,160	7,032	3,250	31,432	5,769

Tabela 22

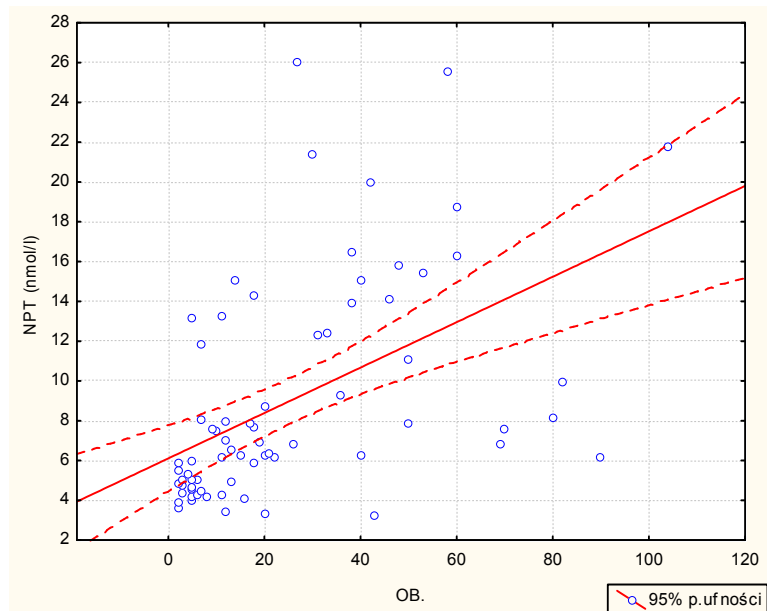
Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w grupie 4: NZJ

Grupa	Stężenie NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
NZJ	59 (71,95%)	23 (28,05%)	82
Ogółem dzieci	158	29	187



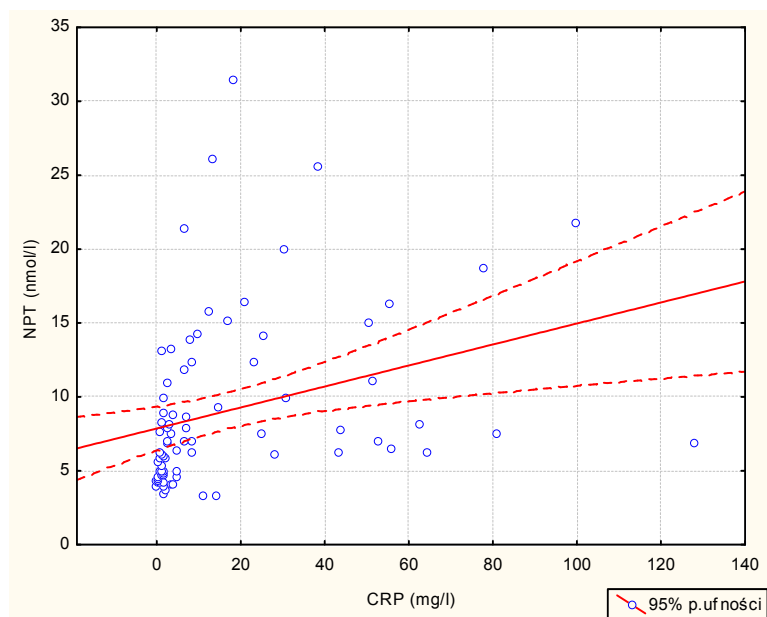
Rycina 33

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w grupie 4: NZJ



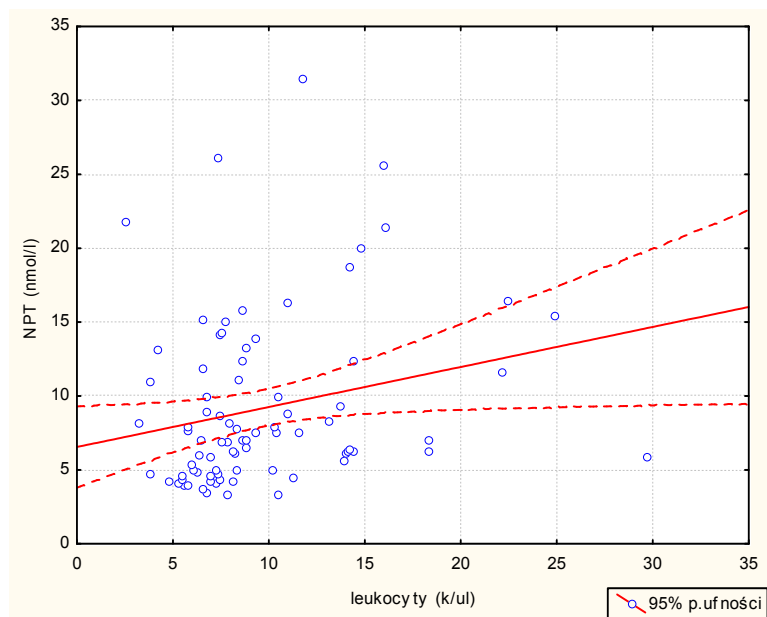
Rycina 34

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w grupie 4: NZJ



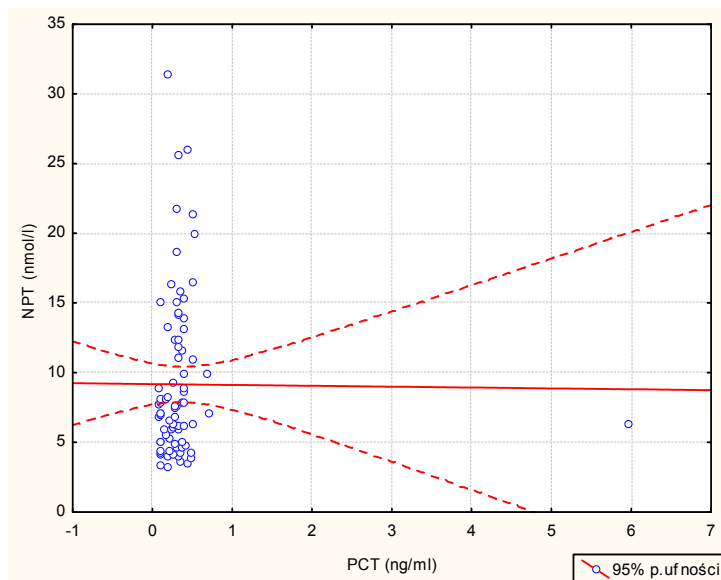
Rycina 35

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w grupie 4: NZJ



Rycina 36

Zależność stężenia NPT w surowicy od liczby leukocytów w grupie 4: NZJ



Rycina 37

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości PCT w grupie 4: NZJ

Tabela 23

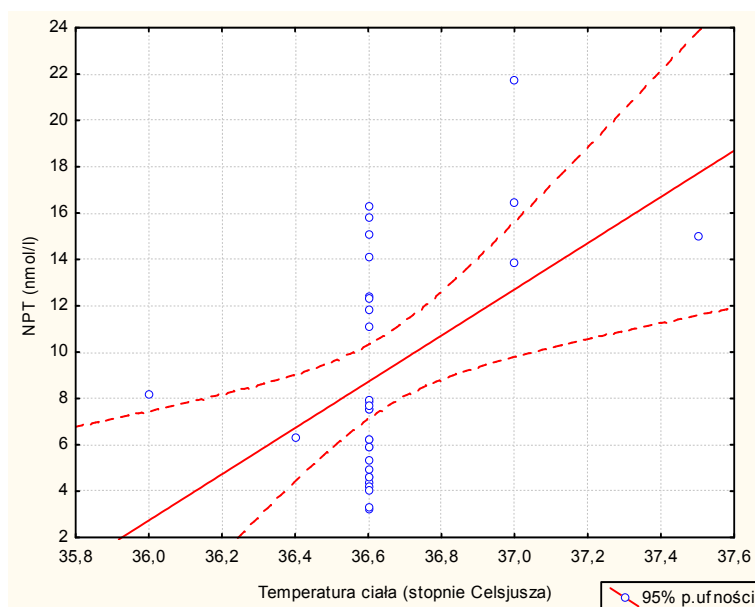
Wartość stężenia NPT w surowicy w zależności od postaci NZJ

Postać NZJ	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
choroba L-C	34	9,718	7,621	3,250	31,432	6,080
wzjg	48	8,764	6,889	3,436	26,052	5,570

Tabela 25

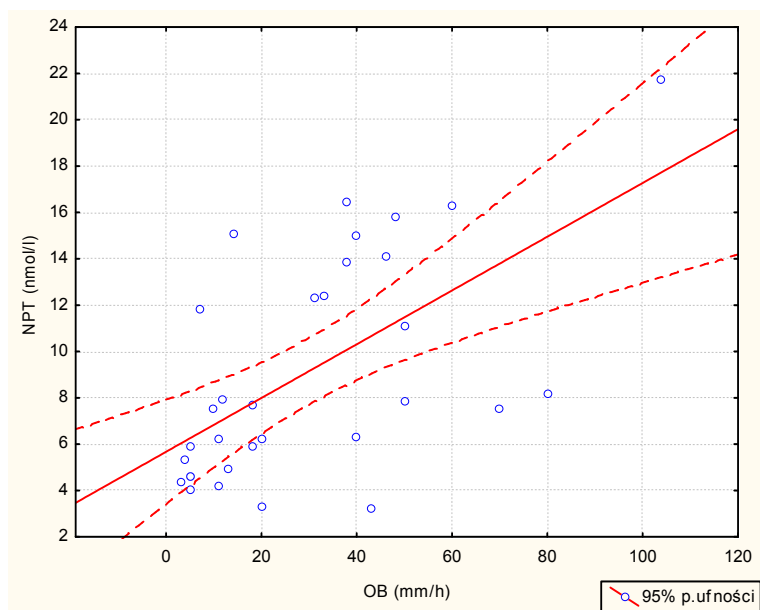
Wartości stężenia NPT w surowicy w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
Choroba L-C	34	9,718	7,621	3,250	31,432	6,080



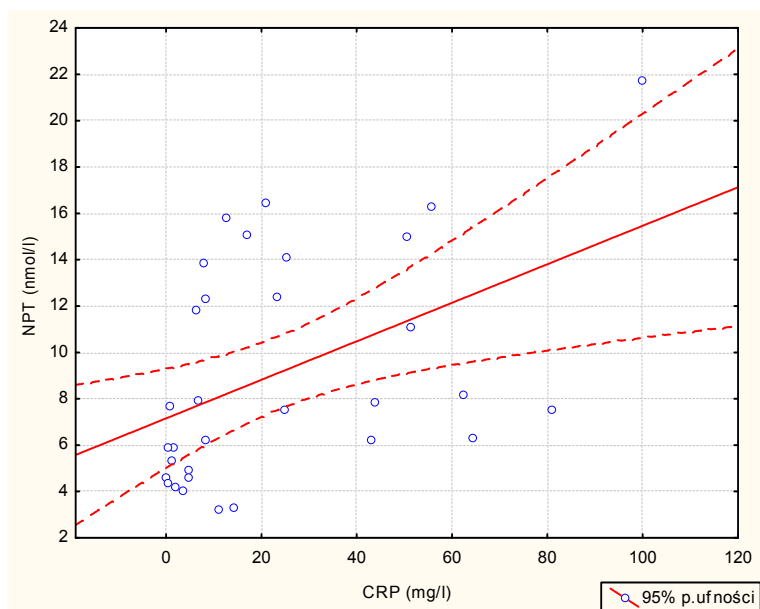
Rycina 39

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna



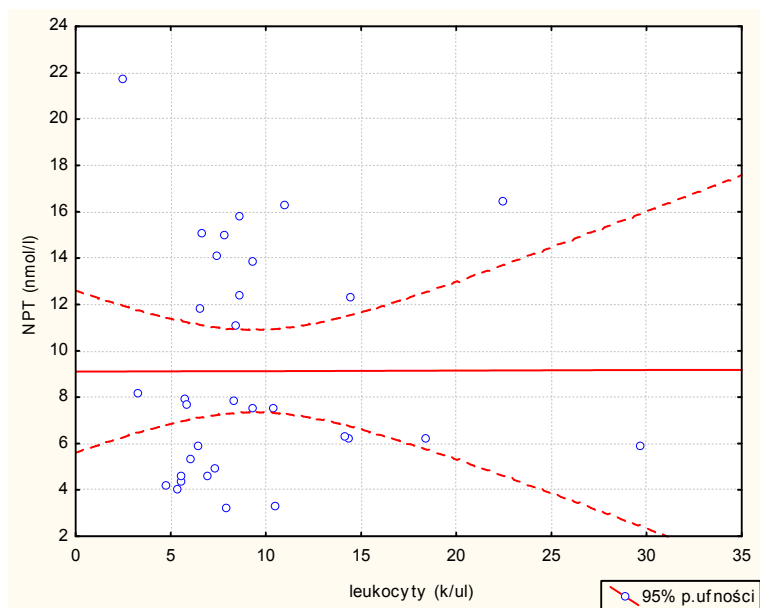
Rycina 40

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna



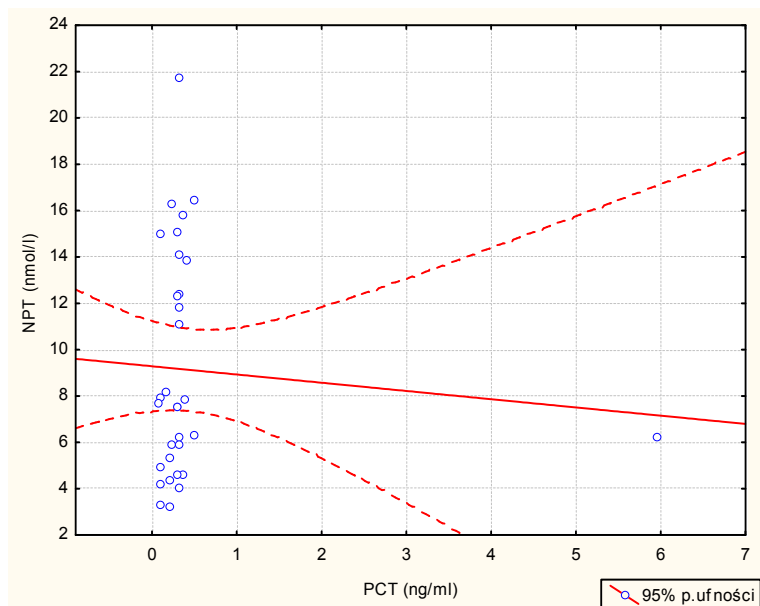
Rycina 41

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna



Rycina 42

Zależność stężenia NPT w surowicy od ilości leukocytów w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna



Rycina 43

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości PCT w podgrupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna

Tabela 26**Pediatriczny wskaźnik aktywności choroby Crohna (Pediatric Crohn's Disease Activity Index- PCDAI) w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego (147)**

Objawy		Punkty
Bóle brzucha	brak	0
	słabe	5
	silne	10
Stolce (ilość dziennie)	< 2, bez krwi	0
	2-5 luźnych lub ślad krwi	5
	> 5 lub znaczne krwawienie	10
Samopoczucie	dobrze (pełna aktywność)	0
	niedobrze (mniejsza aktywność)	5
	złe (znaczne ograniczenie aktywności)	10
Stężenie hemoglobiny (g/dl)	>12	0
	10-12	2,5
	<10	5
OB (mm/h)	<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 twardości i oporu	0
	niewyraźna twardość lub wyczuwalny guz	5
	wyraźna twardość i guz	10
Zmiany okołoodbytnicze	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

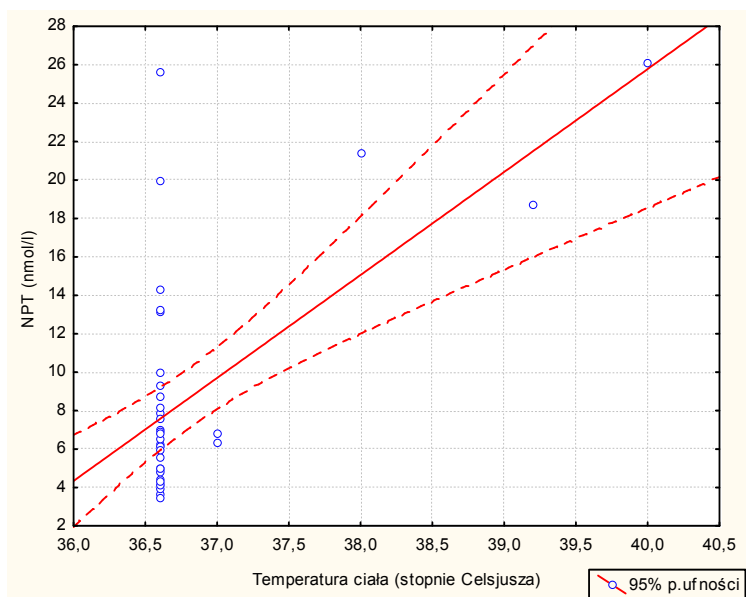
26-50 pkt- umiarkowana postać choroby

powyżej 51 pkt- ciężka postać choroby

Tabela 29

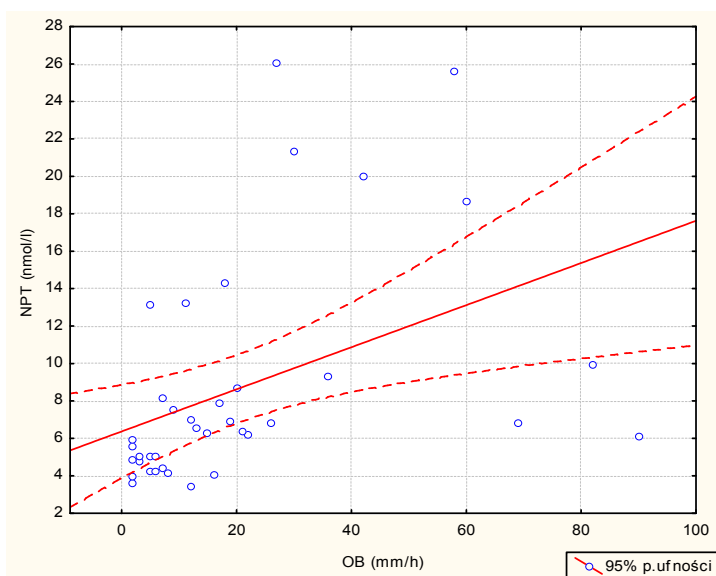
Wartości stężenia NPT w surowicy w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
wzjg	48	8,764	6,889	3,436	26,052	5,570



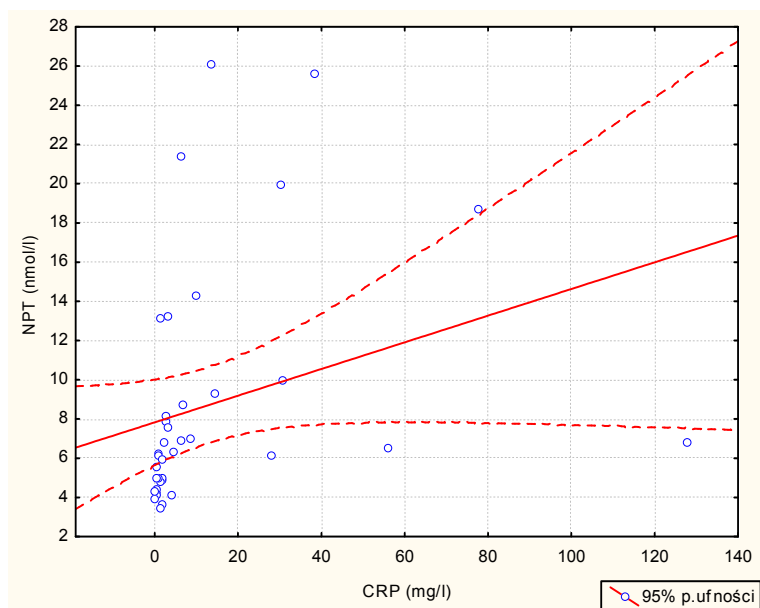
Rycina 45

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego



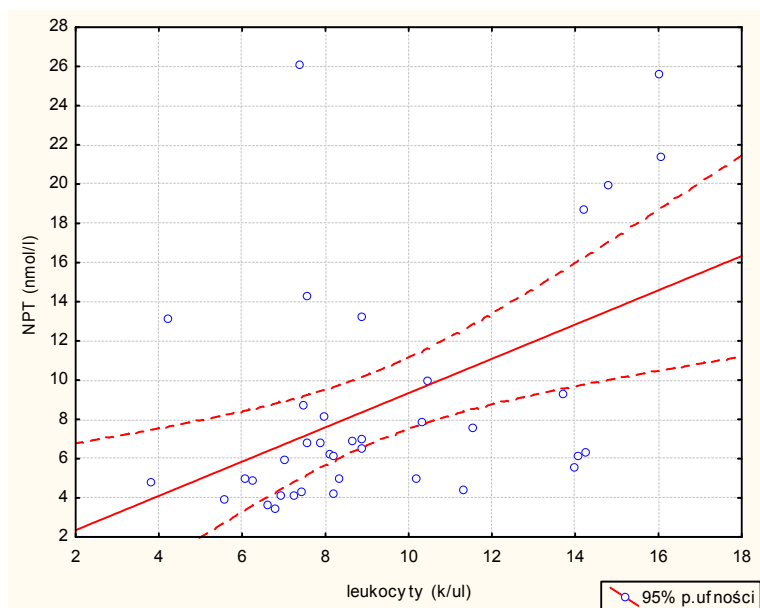
Rycina 46

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego



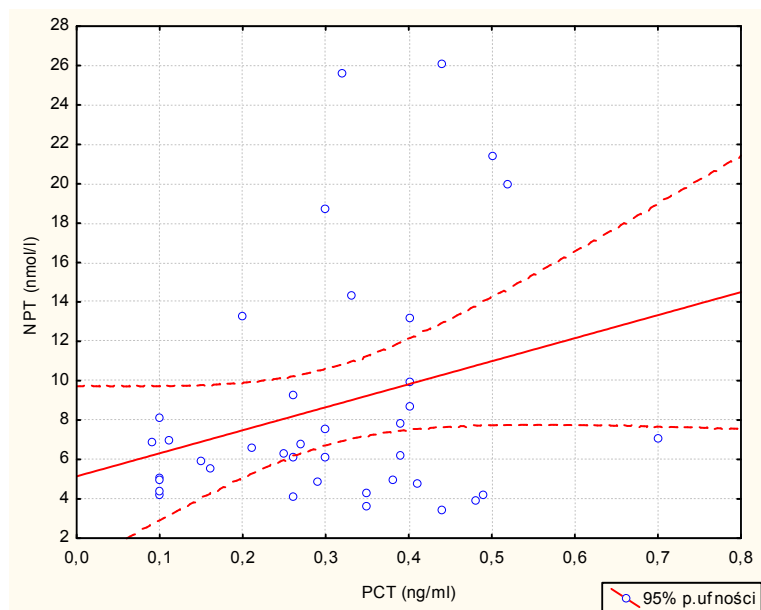
Rycina 47

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego



Rycina 48

Zależność stężenia NPT w surowicy od ilości leukocytów w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego



Rycina 49

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości PCT w podgrupie dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

Tabela 30

Skala Trulove-Wittsa, w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego (147)

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

Ocena aktywności:

0 – 4 pkt - łagodna postać choroby

5 – 8 pkt - umiarkowana postać choroby

9 - 12 pkt - ciężka postać choroby

Tabela 33

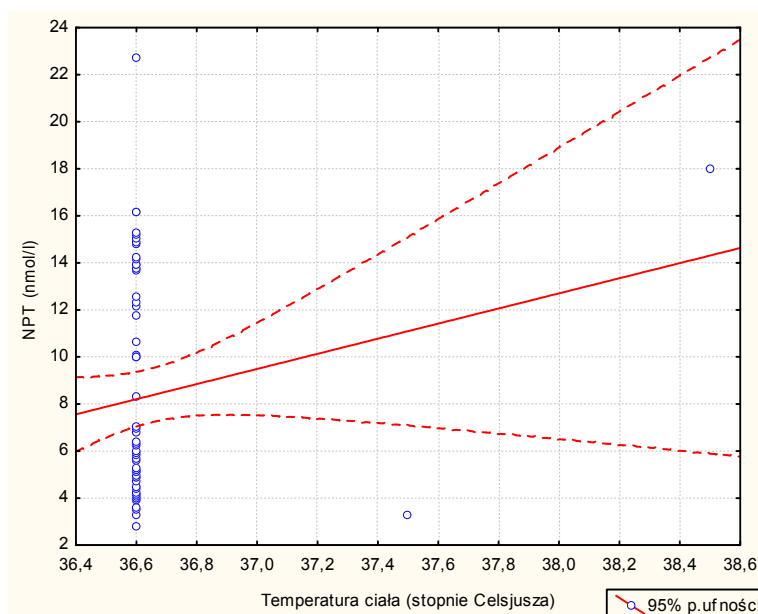
Wartości stężenia NPT w surowicy w grupie dzieci z MIZS w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa	Liczba dzieci	Stężenie NPT (nmol/l)				
		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	SD
KONTROLNA	105	5,471	4,734	2,872	14,779	2,582
MIZS	67	8,339	6,044	2,811	22,765	4,724

Tabela 34

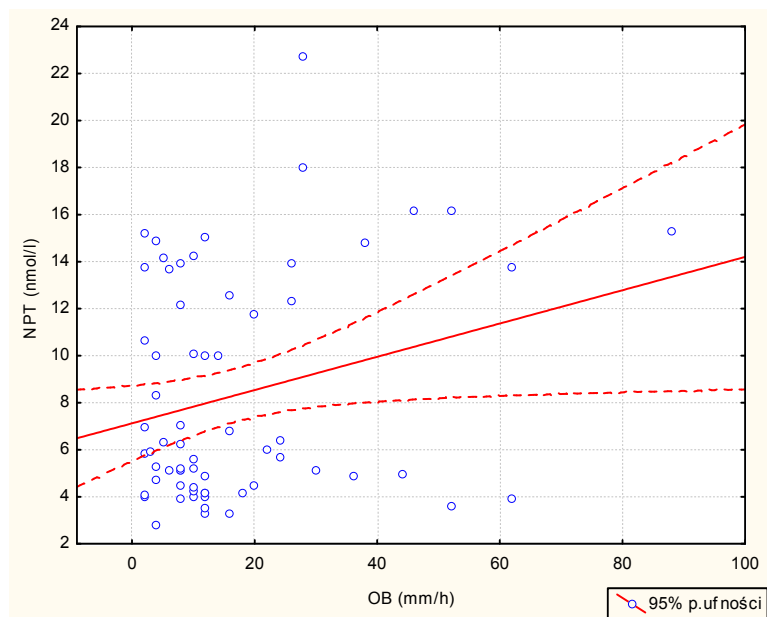
Częstość wyników dodatnich stężenia NPT w surowicy u dzieci w grupie 5: MIZS

GRUPA	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
KONTROLNA	99 (94,29%)	6 (5,71%)	105
MIZS	47 (70,15%)	20 (29,85%)	67
Ogółem dzieci	146	26	172



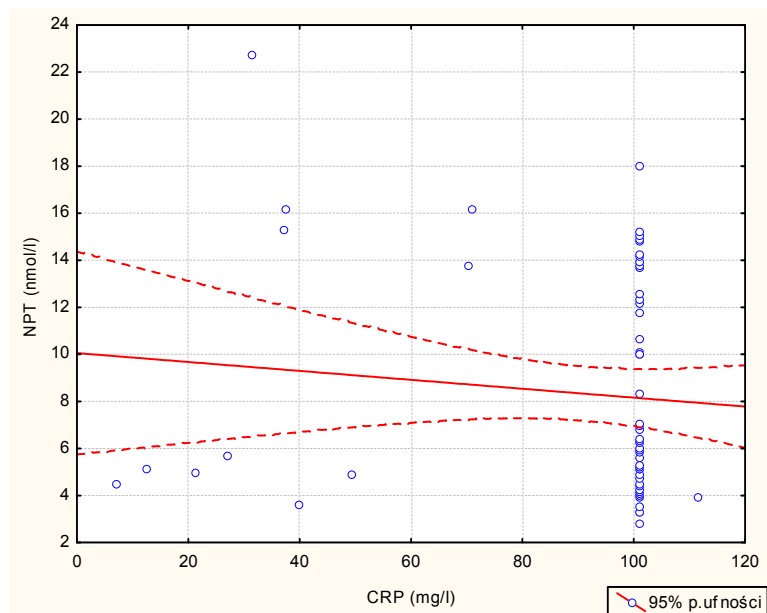
Rycina 52

Zależność stężenia NPT w surowicy od temperatury ciała w grupie 5: MIZS



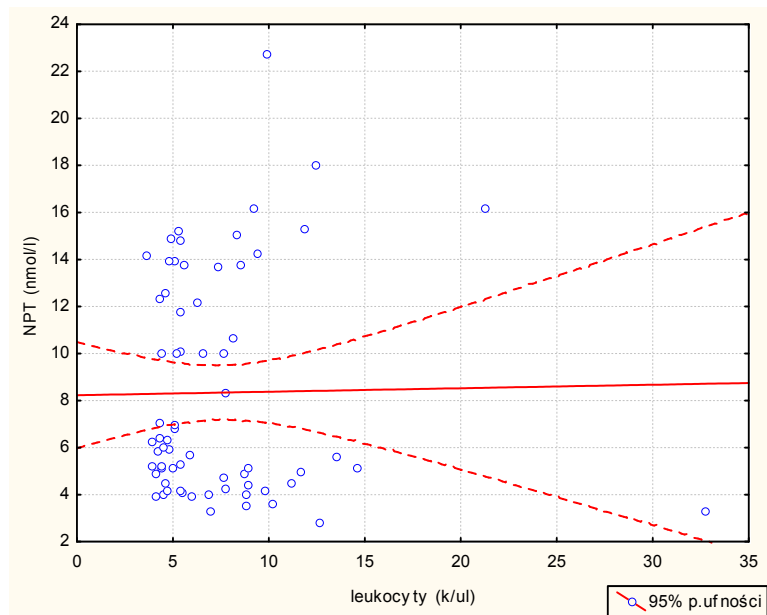
Rycina 53

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości OB w grupie 5: MIZS



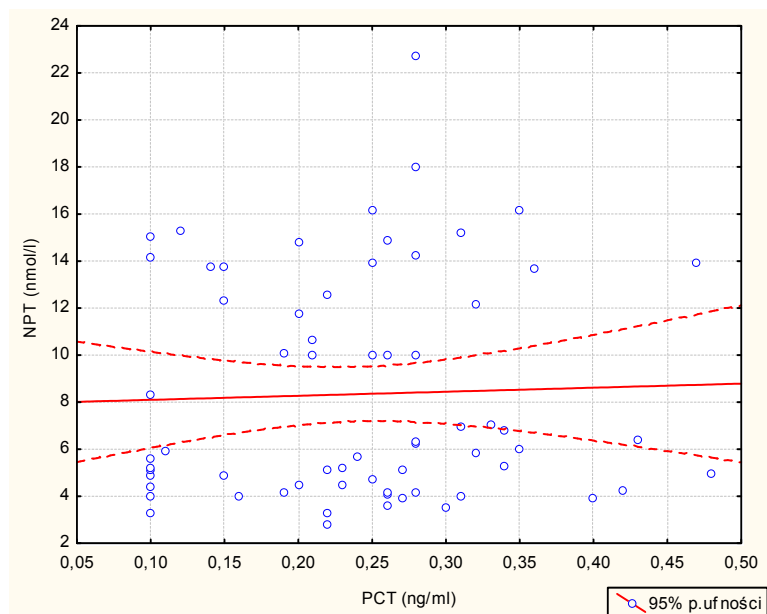
Rycina 54

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości CRP w grupie 5: MIZS



Rycina 55

Zależność stężenia NPT w surowicy od liczby leukocytów w grupie 5: MIZS



Rycina 56

Zależność stężenia NPT w surowicy od wartości PCT w grupie 5: MIZS

Tabela 36

Częstość występowania wyników stężenia NPT w surowicy powyżej wartości referencyjnej w zależności od postaci MIZS

Postać MIZS	Liczba dzieci ze stężeniem NPT (nmol/l)		Liczba dzieci (łącznie)
	poniżej 11	powyżej 11	
Systemowa	4 (44,44%)	5 (55,56%)	9
Skąpostawowa	26 (76,47%)	8 (23,53%)	34
Wielostawowa	17 (70,83%)	7 (29,17%)	24
Ogółem dzieci	47	20	67

Załącznik 1

INFORMACJA DLA RODZICÓW PACJENTA.

Neopteryna to jeden z nowoczesnych parametrów stanu zapalnego. Jej stężenie odzwierciedla aktywację odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Laboratoryjne oznaczanie stężenia neopteryny znajduje zastosowanie m. in. w infekcjach i chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Oznaczanie stężenia neopteryny może służyć jako czynnik różnicujący infekcje bakteryjne od wirusowych. W infekcjach wirusowych wzrost stężenia neopteryny obserwujemy jeszcze przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych oraz wzrostem miana przeciwciał do miana możliwego do oznaczenia. W odróżnieniu od infekcji wirusowej u pacjentów z ostrą infekcją bakteryjną poziom neopteryny nie ulega podwyższeniu. Ustalenie etiologii danej infekcji pozwala pełniej ustalić rozpoznanie oraz wdrożyć odpowiednie leczenie. Celem naszej pracy będzie oznaczenie stężenia neopteryny w surowicy u dzieci hospitalizowanych z powodu potwierdzonego zakażenia bakteryjnego układu moczowego i przewodu pokarmowego oraz potwierdzonego zakażenia wirusowego przewodu pokarmowego. Badaniem objęte zostaną również dzieci hospitalizowane z powodu chorób o podłożu autoimmunologicznym (przewlekłe nieswoiste zapalenia jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów), gdzie oceniona zostanie przydatność kliniczna oznaczania stężenia neopteryny jako parametru monitorującego przebieg choroby. Porównana też zostanie przydatność diagnostyczna oznaczania stężenia neopteryny w surowicy krwi z innymi wykładnikami procesu zapalnego (białko C-reaktywne, prokalcytonina, szybkość opadania krwinek, leukocytoza). Badania mają charakter naukowo – poznawczy bez bieżącej przydatności klinicznej dla pacjenta.

U dziecka pobrane zostaną 0,2 ml (1 kropla) krwi w trakcie pobierania krwi na inne niezbędne badania laboratoryjne konieczne do diagnostyki i leczenia. Badania będą wykonywane w Zakładzie Bakteriologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku, zgodnie z ustalonymi szczegółowymi standardami postępowania. **Wyniki badań będą opracowane zgodnie z ustawą o przetwarzaniu danych osobowych, będą objęte tajemnicą lekarską.**

ZGODA RODZICÓW NA UDZIAŁ DZIECKA W BADANIU.

Imię i nazwisko dziecka:

Data urodzenia:

Adres zamieszkania:

Zostałam/em powiadomiona/y o celu i sposobie przeprowadzenia zamierzonych badań dotyczących przydatności klinicznej neopteryny.

Wyrażam pełną i świadomą zgodę na udział mojego dziecka w tych badaniach.

Podpis badacza

Podpis Rodziców

Gdańsk, dnia

6. STRESZCZENIE

Jednym ze wskaźników aktywności układu immunologicznego, który znalazł zastosowanie kliniczne, jest neopteryna. Podwyższone stężenie neopteryny obserwujemy w schorzeniach, w których pobudzona zostaje odporność immunologiczna typu komórkowego. Pobudzone wówczas limfocyty Th1 uwalniają IFN- γ , który wyzwała neopterynę z monocytów/makrofagów.

Celem pracy była próba ustalenia wartości referencyjnych stężenia neopteryny w surowicy dzieci, z uwzględnieniem płci i wieku, a także ocena przydatności klinicznej oznaczania stężenia neopteryny w wybranych patologiach wieku rozwojowego. Podjęto próbę oceny przydatności klinicznej neopteryny jako parametru różnicującego infekcje o etiologii wirusowej i bakteryjnej oraz parametru monitorującego aktywność procesów immunologicznych w schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym (przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów).

Badaniami objętych zostało 381 pacjentów, w wieku od 1 miesiąca do 17,99 lat. Dzieci te leczone były w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku oraz w Oddziale Dziecięcym Szpitala Reumatologicznego w Sopocie, w okresie od października 2004 do czerwca 2005. Dzieci zdrowe (105 dzieci), stanowiły grupę kontrolną. Oznaczone stężenia neopteryny w surowicy dzieci z tej grupy zostały wykorzystane do wyznaczenia wartości referencyjnych. Pozostałe cztery grupy zawierały 276 dzieci. Dzieci te zostały podzielone na grupy w zależności od rodzaju schorzenia, z powodu jakiego trafiły do Kliniki/Oddziału: 99 dzieci było z infekcjami przewodu pokarmowego (biegunkami), u których została ustalona etiologia (wirusowa, bakteryjna), 28 dzieci z zakażeniami układu moczowego o ustalonej etiologii (bakteryjnej), 82 pacjentów z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit, z różnym stopniem aktywności choroby i 67 dzieci z rozpoznaniem młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem, w okresie zaostrzenia i remisji choroby. U wszystkich zakwalifikowanych dzieci przeprowadzono badanie pediatryczne, podmiotowe i przedmiotowe, a także laboratoryjne badania dodatkowe, wśród których, poza wykonywanymi rutynowo, uwzględniono: pomiar stężenia neopteryny w surowicy oraz pomiar stężenia prokalcytoniny w surowicy. Oznaczenie stężenia neopteryny wykonywano metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Określone w niniejszej pracy wartości referencyjne stężenia neopteryny w surowicy krwi dzieci wynoszą poniżej 11 nmol/l i nie zależą od wieku, ani od płci dziecka. Na podstawie uzyskanych wyników uznano, że neopteryna jest parametrem pozwalającym zróżnicować infekcje o etiologii wirusowej od infekcji bakteryjnych. Oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy może być również przydatne klinicznie jako parametr monitorujący aktywność procesów immunologicznych w takich schorzeniach jak: przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. Oznaczenie stężenia neopteryny w surowicy krwi, jako parametru niezależnego od innych wykładników procesu zapalnego, może stanowić uzupełnienie w diagnostyce stanów zapalnych u dzieci.

Oznaczanie stężenia neopteryny w surowicy można uznać za przydatne klinicznie w wybranych patologiach wieku rozwojowego

9. PIŚMIENNICTWO:

1. Mitaka Ch.: *Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome*. Clin Chim Acta, 2005, 351, 17-29.
2. Naskalski J.: *Postępy w diagnostyce laboratoryjnej w roku 2004*. Med Prakt, 2005, 3, 42-50.
3. Haavik J.: *From butterflies to neurobiology and diagnosis of AIDS. The 100th anniversary of the discovery of pteridines*. Tidsskr Nor Laegeforen, 1989, 109, 1986-1989.
4. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004.
5. Sakurai A., Goto M.: *Neopterin: isolation from human urine*. J Biochem, 1967, 61, 142-145.
6. Wachter H., Grassmayr K., Gutter W. i wsp.: *Urinary low molecular weight products in neoplasia*. Br Med J, 1971, 2, 322-323.
7. Wachter H., Hausen A., Grassmayr K.: *Increased urinary excretion of neopterin in patients with malignant tumors and in with virus diseases*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1979, 360, 12, 1957-60.
8. Hausen A., Bichler A., Fuchs D. i wsp.: *Neopterin, a biochemical indicator of cellular immune reactions, in the detection and control of patients with neoplastic diseases*. Cancer Detect Prev, 1985, 8, 121-128.
9. Huber Ch., Batchelor J., Fuchs D. i wsp.: *Immune response- associated production of neopterin release from macrophages primarily under control of interferon-gamma*. J Exp Med, 1984, 160, 310-316.
10. Werner E., Werner-Felmayer G., Wachter H.: *High-performance liquid chromatographic methods for the quantification of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 684, 51-58.
11. Murr C., Winder B., Wirleitner B. i wsp.: *Neopterin as a marker for immune system activation*. Curr Drug Metab, 2002, 3, 175-187.
12. Leitner K., Meyer M., Leimbacher W. i wsp.: *Low tetrahydrobiopterin biosynthetic capacity of human monocytes is caused by exon skipping in 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase*. Biochem J, 2003, 373, 681-688.
13. Chlabicz S., Rogowska-Szadkowska D.: *Neopteryna- nieswoisty wskaźnik komórkowej odpowiedzi immunologicznej*. Diagn Lab, 1997, 33, 245-251.

14. Gołębiowska B.: *Przydatność diagnostyczna neopteryny u chorych leczonych na oddziale intensywnej terapii*. Praca doktorska, Akademia Medyczna we Wrocławiu, 1999.
15. Brown RR., Lee C., Kohler P. i wsp.: *Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2*. Cancer Res, 1989, 49, 4941-4944.
16. Marth C., Weiss G., Koza A. i wsp.: *Increased production of immune activation marker neopterin by colony-stimulating factors in gynecological cancer patients*. Int J Cancer, 1994, 58, 20-23.
17. Denz H., Fuchs D., Huber H. i wsp.: *Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders*. Eur J Haematol, 1990, 44, 186-189.
18. Brown A., Webster H., Teja- Isavadharm P.: *Macrophage activation in falciparum malaria as aesured by neopterin and interferon- gamma*. Clin Exp Immunol, 1990, 82, 97-101.
19. Fuchs D., Norkrans G., Wejstal R. i wsp.: *Changes of serum neopterin, beta 2-microglobulin and interferon-gamma in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha 2b*. Eur J Med, 1992, 1, 196-200.
20. Fuchs D.: *Neopterin. A message from the Immune System*. BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, 1998.
21. Weiss G., Fuchs D., Hausen A. i wsp.: *Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species*. FEBS Lett, 1993, 321, 89-92.
22. Murr C., Fuith L., Widner B. i wsp.: *Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress?* Anticancer Res, 1999, 19, 1721-8.
23. Renke J.: *Wolnorodnikowe uszkodzenia białek surowicy oraz bariera antyoksydacyjna organizmu w patogenezie młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów*. Praca doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2000.
24. Schroecksnadel K., Murr C., Winkler C. i wsp.: *Neopterin to monitor clinical pathologies involving interferon-gamma production*. Pteridines, 2004, 15, 75-90.
25. Murr C., Fuchs D., Gossler W. i wsp.: *Enhancement of hydrogen peroxide-induced luminol-dependent chemiluminescence by neopterin depends on the presence of iron chelator complex*. FEBS Lett, 1994, 31, 223-226.
26. Wede I., Altindag Z., Widner B. i wsp.: *Inhibition of xantine oxidase by pterins*. Free Radic Res, 1998, 29, 331-338.
27. Kojima S., Nomura T., Icho T. i wsp.: *Inhibitory effects of neopterin on NADPH-dependent superoxide-generating oxidase of rat peritoneal macrophages*. FEBS Lett, 1993, 329, 125-8.

28. Berdowska A., Zwirska-Korczala K.: *Neopterin measurement in clinical diagnosis*. J Clin Pharm Ther, 2001, 26, 319-329.
29. Oettl K., Wirleitner B., Baier- Bitterlich G. i wsp.: *Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin*. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264, 262-267.
30. Oettl K., Greilberger J., Reibnegger G.: *Modulation of free radical formation by pterin derivatives*. Pteridines, 2004, 15, 97-101.
31. Oettl K., Reibnegger G.: *Pteridine derivatives as modulators of oxidative stress*. Curr Drug Metab, 2002, 3, 203-209.
32. Neurauter G., Leblhuber F., Frick B. i wsp.: *Neopterin and oxidation products in patients with neurodegenerative disorders*. Pteridines, 2002, 13, 50.
33. Hoffmann G., Schobersberger W., Frede S. i wsp.: *Neopterin activates transcription factor nuclear factor-kappa B in vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1996, 391, 181-184.
34. Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Murr C. i wsp.: *Effect of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on tumor necrosis factor- alpha induced programmed cell death*. FEBS Lett, 1995, 364, 234-238.
35. Schobersberger W., Hoffmann G., Hobisch-Hagen P. i wsp.: *Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2*. FEBS Lett, 1996, 397, 263-268.
36. Pagel H., Fandrey J., Schobersberger W. i wsp.: *Effects of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoetin production*. Eur J Haematol, 1999, 62, 341-345.
37. Uberall F., Werner-Felmayer G., Schubert C. i wsp.: *Neopterin derivatives together with cyclic guanosine monophosphate induce c-fos gene expression*. FEBS Lett, 1994, 352, 11-14.
38. Wirleitner B., Schroecksnadel K., Winkler C. i wsp.: *Neopterin in HIV-1 infection*. Mol Immunol, 2005, 42, 183-194.
39. Werner E., Bichler A., Daxenbichler G. i wsp.: *Determination of neopterin in serum and urine*. Clin Chem, 1987, 33, 1, 62-66.
40. Millner M., Franthal W., Thalhammer G.: *Neopterin concentrations in cerebral fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children*. Clin Chem, 1998, 44, 161-167.
41. Satoh T. Brown L., Blattner W. i wsp.: *Serum neopterin, β -2-microglobulin, soluble interleukin-2 receptors, and immunoglobulin levels in healthy adolescent*. Clin Immunol Immunopatol, 1998, 88, 176-182.

42. Estelberger W., Weiss G., Petek W. i wsp.: *Determination of renal clearance of neopterin by a pharmacokinetic approach*. FEBS Lett, 1993, 329, 13-16.
43. Muller M., Curtius H., Herold M. i wsp.: *Neopterin in clinical practice*. Clin Chim Acta, 1991, 2001, 1-16.
44. Ormazabal A., Garcia-Cazorla A., Fernandez Y. i wsp.: *HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins*. J Neuroscience Methods, 2005, 142, 153-158.
45. Vrecko K., Staedtler P., Mischak I. i wsp.: *Periodonitis and concentrations of the cellular immune activation marker neopterin in saliva and urine*. Clin Chim Acta, 1997, 268, 31-40.
46. Denz H., Fuchs D., Hausen A. i wsp.: *Value of urinary neopterin in the differential diagnosis of bacterial and viral infections*. Klin Wochenschr, 1990, 68, 218-222.
47. Shaw A.: *Serum C-reactive protein and neopterin concentrations in patients with viral or bacterial infection*. J Clin Pathol, 1991, 44, 596-599.
48. Reibnegger G., Auhuber I., Fuchs D. i wsp.: *Urinary neopterin levels in acute viral hepatitis*. Hepatology, 1988, 8, 771-774.
49. Zaknun D., Weiss G., Glatzl J. i wsp.: *Neopterin levels during acute rubella in children*. Clin Infect Dis, 1993, 17, 521-522.
50. Griffin D., Ward B., Jaguregui E. i wsp.: *Immune activation during measles: Interferon gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease*. J Infect Dis, 1990, 161, 449-453.
51. Jungraithmayr T., Reschke M., Grebe S. i wsp.: *Assesment of cytomegalovirus infections using neopterin and a new immunoblot*. Clin Chim Acta, 2001, 310, 63-69.
52. Inci Fisenk B., Us D., Ozcebe O. i wsp.: *The value of increased neopterin levels in reducing transfusion-transmitted virus infections: detection of a donation from a HBsAg positive chronic carrier by screening of neopterin in Turkish blood donors*. Scand J Infect Dis, 2005, 37, 599-604.
53. Tilg H., Margreiter R., Scriba M. i wsp.: *Clinical presentation of CMV infection in solid organ transplant recipients and its impact on graft rejection and neopterin excretion*. Clin Transplant, 1987, 1, 37-43.
54. Kiepiela P., Smith A., Rosenberg E.: *Laboratory markers associated with progression of HIV infection*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005, 19, 243-254.
55. Żaba R., Bowszyc J., Kiczka W. i wsp.: *Monitorowanie immunologiczne wczesnych okresów zakażenia HIV*. Przegl Dermatol, 1996, 83, 509-516.

56. Hutterer J., Armbruster C., Wallner G. i wsp.: *Early changes of neopterin concentrations during treatment of human immunodeficiency virus infection with zidovudine*. J Infect Dis, 1992, 165, 783-784.
57. Kramer A., Biggar R., Hampl H. I wsp.: *Immunologic markers of progression to acquired immunodeficiency syndrome are time-dependent and illness-specific*. Am J Epidemiol, 1992, 136, 71-80.
58. Halota W., Jaruga B., Pawlowska M.: *Stężenia neopteryny i alfa-2-mikroglobuliny w surowicy jako „markery prognostyczne” historii naturalnej AIDS*. Pol Merkuriusz Lek, 2002, 13, 126-128.
59. Fahey J., Taylor J., Detels R. I wsp.: *The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1*. N Engl J Med, 1990, 322, 166-172.
60. Zangerle R., Fuchs D., Reibnegger G. i wsp.: *Markers for disease progression in intravenous drug users infected with HIV-1*. AIDS, 1991, 5, 985-991.
61. Zangerle R., Steinhuber S., Sarcletti M. i wsp.: *Serum HIV-1 RNA levels compared to soluble markers of immune activation to predict disease progression in HIV-1-infected individuals*. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 116, 228-239.
62. Zheng B., Cao K., Chan C. i wsp.: *Serum neopterin for early assessment of severity of severe acute respiratory syndrome*. Clin Immunol, 2005, 116, 18-26.
63. Immanuel C., Rajeswari R., Rahman F. i wsp.: *Serial evaluation of serum neopterin in HIV seronegative patients treated for tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2001, 5, 185-190.
64. Immanuel C., Swamy R., Kannapiran M. i wsp.: *Neopterin as a marker for cell-mediated immunity in patients with pulmonary tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 1997, 1, 175-180.
65. Stoycheva M., Murdjeva M.: *Cytokines in Salmonella infections*, Folia Med (Plovdiv), 2004, 46, 5-10.
66. Diez-Ruiz A., al-Amrani M., Weiss G.: *Increased interferon-gamma and neopterin concentrations in patients with acute brucellosis*. J Infect Dis, 1993, 167, 504-505.
67. Doffinger R., Patel S., Kumararatne D.: *Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections*. Curr Opin Rheumatol, 2005, 17, 440-446.
68. Fuchs D., Hausen A., Kofler M. i wsp.: *Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis*. Lung, 1984, 162, 337-346.
69. Horak E., Gassner I., Solder B. i wsp.: *Neopterin levels and pulmonary tuberculosis in infants*. Lung, 1998, 176, 337-344.

70. Reibnegger G., Boonpucknavig V., Fuchs D. i wsp.: *Urinary neopterin is elevated in patients with malaria*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1984, 78, 545-546.
71. Rudkowski Z. (red) *Choroby zakaźne i pasożytnicze u dzieci*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001, str.252.
72. Czarnowski D., Wiercińska-Drapała A., Prokopowicz D.: *Beta2-mikroglobulina i neopteryna u pacjentów z giardiozą*. Wiad Parazytol, 2000, 46, 487-492.
73. Campbell DI., McPhail G., Lunn P. i wsp.: *Intestinal inflammation measured by fecal neopterin in Gambian children with enteropathy: association with growth failure, Giardia lamblia, and intestinal permeability*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004, 39, 153-157.
74. Fuchs D., Chiodi F., Albert J. i wsp.: *Neopterin concentrations in cerebral fluid and serum of individuals infected with HIV-1*. AIDS, 1989, 3, 285-288.
75. Hagberg L., Dotevall L., Norkrans G. i wsp.: *Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection*. J Infect Dis, 1993, 168, 1285-1288.
76. Griffin D., McArthur J., Cornblath D.: *Neopterin and interferon-gamma in serum and cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurologic disease*. Neurology, 1991, 41, 69-74.
77. Azumagawa K., Suzuki S., Tanabe T. i wsp.: *Neopterin, biopterin, and nitric oxide concentrations in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system infections*. Brain Dev, 2003, 25, 200-202.
78. Gasse T., Murr C., Meyersbach P.: *Neopterin production and tryptophan degradation in acute Lyme neuroborreliosis versus late Lyme encephalopathy*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994, 32, 685-689.
79. Dotevall L., Fuchs D., Reibnegger G. i wsp.: *Cerebrospinal fluid and serum neopterin levels in patients with Lyme neuroborreliosis*. Infection, 1990, 18, 210-214.
80. Strohmaier W., Redl H., Schlag G. i wsp.: *D-erythro-neopterin plasma levels in intensive care patients with and without septic complications*. Crit Care Med, 1987, 15, 757-760.
81. Strohmaier W., Poigenfurst J., Mauritz W.: *Neopterin blood levels: a basis for detecting to use antibiotics in Intensive Care Unit patients*. Pteridines, 1996, 7, 1-4.
82. Mabrouk A., Shetta A.: *Serum neopterin and plasma endotoxins as predictors of endotoxaemia in burned patients*. Ann Burns Fire Disasters, 1998, 11, 80-86.
83. Yao Y., Yu Y., Wang Y. i wsp.: *Elevated serum neopterin level: its relation to endotoxemia and sepsis in patients with major burns*. Eur J Clin Invest, 1996, 26, 224-230.

84. Reibnegger G., Egg D., Fuchs D. i wsp.: *Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1986, 29, 1063-1070.
85. Maerker-Alzer G., Diemer O., Strumper R. i wsp.: *Neopterin production in inflamed knee joints: high levels in synovial fluids*. *Rheumatol Int*, 1986, 6, 151-154.
86. Lim K., Muir K., Powell R.: *Urine neopterin: A new parametr for serial minitoring of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 1994, 53, 743-748.
87. Samsonov M., Tilz G., Egorova O. i wsp.: *Serum soluble markers of immune activation and disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 1995, 4, 29-32.
88. Mahmoud R., El-Gendi H., Ahmed H.: *Serum neopterin, tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptor II (p75) levels and disease activity in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus*. *Clin Biochem*, 2005, 38, 134-141.
89. Samsonov M., Nassonov E., Tilz G. i wsp.: *Elevated serum levels of neopterin in adult patients with polymyositis/ dermatomyositis*. *Br J Rheum*, 1997, 36, 656-660.
90. Prior Ch., Bollbach R., Fuchs D.: *Urinary neopterin, a marker of clinical activity in patients with Crohn's disease*. *Clin Chim Acta*, 1986, 155, 11-22.
91. Reibnegger G., Bollbach R., Fuchs D. i wsp.: *A simple index relating clinical activity in Crohn's disease with T cell activation: hematocrit, frequency of liquid stools and urinary neopterin as parameters*. *Immunobiology*, 1986, 173, 1-11.
92. Niederwieser D., Fuchs D., Hausen A. i wsp.: *Neopterin as a new biochemical marker in the clinical assessment of ulcerative colitis*. *Immunobiology*, 1985, 170, 320-326.
93. Reibnegger G., Fuchs D., Fuith L. i wsp.: *Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease*. *Cancer Detect Prev*, 1991, 15, 483-490.
94. Murr C., Bergant A., Widschwendter M. i wsp.: *Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer*. *Clin Chem*, 1999, 45, 1998-2004.
95. Tanaka J., Koshimura K., Tsumori M. i wsp.: *Monitoring of urine nitric oxide (NO) related substrates and immunological competence in hematological malignancy*. *Acta Bioch Pol*, 2002, 49, 227-232.
96. Reibnegger G., Krainer M., Herold M. i wsp.: *Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma*. *Cancer Res*, 1991, 51, 6250-6253.
97. Reibnegger G., Bichler A., Dapunt O. i wsp.: *Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix*. *Cancer Res*, 1986, 46, 950-955.

- 98.** Reibnegger G., Hetzel H., Fuchs D. i wsp.: *Clinical significance of neopterin for prognosis and follow-up in ovarian cancer*. Cancer Res, 1987, 47, 4977-4981.
- 99.** Weiss G., Kronberger P., Conrad F. i wsp.: *Neopterin and prognosis in patients with adenocarcinoma of the colon*. Cancer Res, 1993, 53, 260-265.
- 100.** Kronberger P., Weiss G., Tschmelitsch J. i wsp.: *Predictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995, 33, 831-837.
- 101.** Prommegger R., Winder B., Murr C. i wsp.: *Neopterin: a prognostic variable in operations for lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2000, 70, 1861-1864.
- 102.** Lewenhaupt A., Ekman P., Eneroth P. i wsp.: *Serum levels of neopterin as related to the prognosis of human prostatic carcinoma*. Eur Urol, 1986, 12, 422-425.
- 103.** Kawasaki H., Watanabe H., Yamada S. i wsp.: *Prognostic significance of urinary neopterin levels in patients with hepatocellular carcinoma*. Tohoku J Exp Med, 1988, 155, 311-318.
- 104.** Denz H., Orth B., Weiss G. i wsp.: *Weight loss in patients with hematological neoplasias is associated with immune system stimulation*. Clin Investig, 1993, 71, 37-41.
- 105.** Muller T., Keuchel M., Schindler S. i wsp.: *Differential diagnosis of transplant function disorders in therapy with monoclonal antibodies OKT3*. Helv Chir Acta, 1991, 58, 271-275.
- 106.** Reibnegger G., Aichberger C., Fuchs D. i wsp.: *Posttransplant neopterin excretion in renal allograft recipients- a reliable diagnostic aid for acute rejection and a predictive marker of long-term graft survival*. Transplantation, 1991, 52, 58-63.
- 107.** Muller T., Vogl M., Neumann M. i wsp.: *Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation*. Clin Chim Acta, 1998, 276, 63-74.
- 108.** Hausen A., Aichberger C., Konigsrainer A. i wsp.: *Biliary and urinary neopterin concentrations in monitoring liver-allograft recipients*. Clin Chem, 1993, 39, 45-47.
- 109.** Konigsrainer A., Reibnegger G., Ofner D. i wsp.: *Pancreatic juice neopterin excretion- reliable marker for detection of pancreatic allograft rejection*. Transplant Proc, 1990, 22, 671-672.
- 110.** Margreiter R., Aichberger C., Konigsrainer A. i wsp.: *Biliary neopterin for differentiation between liver allograft rejection and viral graft infection*. Transpl Int, 1992, 5, Suppl 1, S199-200.
- 111.** Niederwieser D, Huber C., Gratwohl A. i wsp.: *Neopterin as a new biochemical marker in the clinical monitoring of bone marrow transplant recipients*. Transplantation, 1984, 38, 497-500.

112. Gisslen M., Norkrans G., Svennerholm B. i wsp.: *The effect on human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in cerebrospinal fluid after initiation of zidovudine or didanosine.* J Infect Dis, 1997, 175, 434-437.
113. Amirayan- Chevillard N., Tissot- Dupont H., Obadia Y. i wsp.: *Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) and circulating markers of immune activation : specific effect of HAART on neopterin.* Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7, 832-834.
114. Schennach H., Schoenitzer D., Fuchs D.: *Association between chronic hepatitis C virus infection and increased neopterin concentrations in blood donations.* Clin Chem, 1998, 44, 2225-2226.
115. Honlinger M., Fuchs D., Hausen A. i wsp.: *Serum- Neopterinbestimmung zur zusatzlichen sicherung det bluttransfusion.* Dtsch Med Wschr, 1989, 114, 172-176.
116. Schennach H., Schoenitzer D.: *Neopterin screening in blood donations and infectious risk.* Pteridines, 2003, 14, 57.
117. Słowik M., Mańkowski T.: *Nietypowa postać fenyloketonurii spowodowana brakiem aktywności syntetazy dihydrobiopterynowej.* Polski Tygodnik Lekarski, 1992, XLVII, 236-237.
118. Erren M., Reinecke H., Junker R. i wsp.: *Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19, 2355-2363.
119. Świętochowska E., Wielkoszyński T., Motyka M. i wsp.: *Ocena stężeń lipoproteiny A oraz wybranych wskaźników odpowiedzi zapalnej u pacjentów poddawanych zabiegom endarterektomii tętnic szyjnych.* Czyn Ryz, 2003, 2/4, 48-55.
120. Garcia-Moll X., Coccolo F., Cole D. i wsp.: *Serum neopterin and complex stenosis morphology in patients with unstable angina.* J Am Coll Cardiol, 2000, 35, 956-962.
121. Avanzas P., Arroyo- Espliguero R., Quiles J. i wsp.: *Elevated serum neopterin predicts future adverse cardiac events in patients with chronic stable angina pectoris.* Eur Heart J, 2005, 26, 457-463.
122. Błędowski D., Stolarz W., Wilczek K. i wsp.: *Przydatność oznaczania stężenia neopteryny w diagnostyce chorób wątroby.* Doniesienie zjazdowe, VII Konferencja Naukowo- Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Hepatologicznego pt.: „Postępy w Hepatologii”, Mikołajki, 2005.
123. Wilmer A., Nolchen B., Tilg H. i wsp.: *Serum neopterin concentrations in chronic liver disease.* Gut, 1995, 37, 108-112.
124. Yaman H., Cakir E., Ozcan O. i wsp.: *Elevated urine neopterin levels in nonalcoholic steatohepatitis.* Clin Biochem, 2005, 38, 187-190.

125. Ledochowski M., Murr C., Jager M. i wsp.: *Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation*. *Exp Gerontol*, 2001, 36, 1739-1747.
126. Ledochowski M., Murr C., Widner B. i wsp.: *Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations*. *Clin Chim Acta*, 1999, 282, 115-123.
127. Leblhuber F., Walli J., Demel U. i wsp.: *Increased serum neopterin concentrations in patients with Alzheimer's disease*. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37, 429-431.
128. Schroecksnadel K., Leblhuber F., Frick B. i wsp.: *Association of hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease with elevated neopterin levels*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2004, 18, 129-133.
129. Leblhuber F., Walli J., Jellinger K. i wsp.: *Activated immune system in patients with Huntington's disease*. *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36, 747-750.
130. Leblhuber F., Walli J., Tilz G. i wsp.: *Increased serum neopterin concentrations in a patient with Creutzfeldt- Jakob disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1996, 61, 211-212.
131. Mehta P., Patric B., Dalton A. i wsp.: *Increased serum neopterin levels in adults with Down syndrome*. *J Neuroimmunol*, 2005, 164, 129-133.
132. Radkowski M., Olszewska D.: *Odporność przeciwwzakazna*, w: Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W. (red): *Immunologia*, PWN, Warszawa, 2004, 337-355.
133. Lydyard P.M., Whelan A., Fanger M.W.: *Krótkie wykłady. Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
134. Salyers A., Whitt D.: *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotworczość i środowisko*, PWN, Warszawa, 2003, 257-278.
135. Jakóbiśiak M., Gołąb J.: *Odporność nieswoista* w: : Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W. (red): *Immunologia*, PWN, Warszawa, 2004, 131-156.
136. Kamińska B. *Nieswoiste zapalenia jelit u dzieci* w: Korzon M., Kamińska B., Szarszewski A.(red): *Choroby jelita grubego u dzieci*. Wydawnictwo Marszałek, Toruń, 2004, 39-64.
137. Chojnacki J., Wichan P.: *Tło patogenetyczne i zasady leczenia zachowawczego przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit*. *Ped Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dz*, 2004, 6, 441-447.
138. Ryżko J.: *Nieswoiste zapalenia jelit*, w: Socha J.: *Choroby autoimmunologiczne u dzieci*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005, 182-204.
139. Kmieć Z., Kartanowicz D., Wierzbicki P.: *Rola odpowiedzi immunologicznej w patogenezie chorób przewodu pokarmowego*. *Ped Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dz*, 2004, 6, 417-422.

140. Wojtuń S., Gil J.: *Podstawowe wykładniki etiopatogenetyczne i kliniczne nieswoistych zapaleń jelit*. Stand Med, 2004, 9, 917-922.
141. Kontny E., Maśliński W.: *Patogeneza chorób reumatycznych* w: Romicka A., Rostropowicz- Denisiewicz K. (red): *Zapalne choroby reumatyczne w wieku rozwojowym*. PZWL, Warszawa, 2005, 16-42.
142. Hamerlinck F.F.V.: *Neopterin: a review*. Exp Dermatol, 1999, 8, 167-176.
143. Rider L., Schiffenbauer A., Zito M. i wsp.: *Neopterin and quinolinic acid are surrogate measures of disease activity in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies*. Clin Chem, 2002, 48, 1681-1688.
144. Marek K.: *Niedożywienie białkowo- kaloryczne u dzieci- udział interleukiny 12 w patogenezie obniżonej komórkowej odpowiedzi immunologicznej*. Praca doktorska. Akademia Medyczna w Gdańsku, 2005.
145. Laich A., Neurauder G., Wirleitner B. i wsp.: *Degradation of serum neopterin during daylight exposure*. Clin Chim Acta, 2002, 322, 175-178.
146. Meisner M.: *Procalcitonin (PCT). A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York, 2000.
147. Moczko J., Bręborowicz G.H., Tadeusiewicz R.: *Statystyka w badaniach medycznych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998.
148. Altman G.G.: *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall, USA, 1991.
149. Ryżko J., Woynarowski M.: *Zastosowanie skali punktowej w ocenie aktywności choroby Leśniowskiego – Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci*. Ped Pol, 1995, 70, 585-589.
150. Zeman K. (red): *Zaburzenia odporności u dzieci*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2002.
151. Radunovic N., Kuczynski E., Rebarber A. i wsp.: *Neopterin concentrations in fetal and maternal blood: a marker of cell-mediated immune activation*. Am J Obstet Gynecol, 1999, 181, 170-173.
152. Parrak V., Chovancova D., Divinec L. i wsp.: *Neopterin in neonates*. Pteridines, 2003, 14, 54.
153. Reibnegger G., Huber L., Jurgens G. i wsp.: *Approach to define "normal aging" in man. Immune function, serum lipids, lipoproteins and neopterin levels*. Mech Ageing Dev, 1988, 46, 67-82.
154. Murr C., Hainz U., Asch E. i wsp.: *Association of increased neopterin production with decreased humoral immunity in the elderly*. Exp Gerontol, 2003, 38, 583-587.

- 155.** Frick B., Schroecksnadel K., Neurauder G. i wsp.: *Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age*. Clin Biochem, 2004, 37, 684-687.
- 156.** Sack U., Burkhardt U., Borte M. i wsp.: *Age-dependent levels of select immunological mediators in sera of healthy children*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998, 5, 1, 28-32.
- 157.** Honlinger M., Fuchs D., Reibnegger G. i wsp.: *Neopterin screening and acute cytomegalovirus infections in blood donors*. Clin Investig, 1992, 70, 63.
- 158.** Schennach H., Murr C., Gachter E. i wsp.: *Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors*. Clin Chem, 2002, 48, 643-645.
- 159.** Wiedermann F., Innerhofer P., Margreiter J. i wsp.: *Procalcitonin and neopterin in infectious diseases*. Pteridines, 1999, 10, 125-132.
- 160.** Fuchs D., Weiss G., Reibnegger G., i wsp.: *The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1992, 29, 307-41.
- 161.** Fuchs D., Stahl-Hennig C., Gruber A. i wsp.: *Neopterin- is clinical use in urinalysis*. Kidney Int, 1994, 46, suppl.47, S 8- S 11.
- 162.** Okumara A., Takemoto K., Ozaki T. i wsp. *Serum beta-2-microglobulin and neopterin levels in children with febrile illness: their relation to influenza and febrile seizures*. J Ped Neurol, 2003, 1, 35-38.
- 163.** Niederwieser D., Joller P., Seger R. i wsp.: *Neopterin in AIDS, other immunodeficiencies, and bacterial and viral infections*. Klin Wochenschr, 1986, 64, 333-337.
- 164.** Graessl G., Horak E., Sutterluty H. i wsp.: *Urinary neopterin concentrations in children with asthma and infection*. Twentieth International Winter-Workshop on Clinical, Chemical, and Biochemical Aspects of Pteridines, Pteridines 2001, 12, 1-28.
- 165.** Fuchs D., Wachter H.: *Neopterin in Lothar T.: Clinical Laboratory Diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, Germany, 1998.
- 166.** Murr C., Neurauder G., Wirleitner B. i wsp.: *Neopterin to predict prognosis of infection and neoplasia*. International EuroGin Conference, Vilnius, 8-10.09.2001.
- 167.** Rudkowski Z., Szenbron L.: *Salmonellozy*. Stand Med. Ped, 2002, 4, 636-645.
- 168.** Werner-Felmayer G., Werner E., Fuchs D. i wsp.: *Tumor necrosis facto-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced tryptophan degradation and pteridine synthesis in human cells*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1989, 370, 1063-1069.

169. Bloom J.N., Suffredini A.F., Parrillo J.E. i wsp. : *Serum neopterin levels following intravenous endotoxin administration to normal humans*. Immunobiology, 1990, 181, 317-323.
170. Nasonov E., Samsonov M., Tilz G. I wsp.: *Serum concentrations of neopterin, soluble interleukin 2 receptor, and soluble tumor necrosis receptor in Wegner's granulomatosis*. J Rheumatol, 1997, 24, 666-670.
171. Lim K., Jones A., Brown N. i wsp.: *Urine neopterin as a parameter of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: comparison with serum sIL-2R and antibodies to dsDNA, erythrocyte sedimentation rate, and plasma C3, C4, and C3 degradation products*. Ann Rheum Dis, 1993, 52, 429-435.
172. Forrest C., Youd P., Kennedy A. i wsp.: *Purine, kynurenine, neopterin and lipid peroxidation levels in inflammatory bowel disease*. J Biomed Sci, 2002, 9, 436-442.
173. Granditsch G., Fuchs D., Hausen A. i wsp.: *Urinary neopterin as a marker for disease activity in children and adolescent with Crohn's disease*. Pteridines, 1990, 2, 23-27.
174. Judmaier G., Meyersbach P., Weiss G. i wsp.: *The role of neopterin in assessing disease activity in Crohn's disease: classification and regression trees*. Am J Gastroenterol, 1993, 88, 706-711.
175. Duclos B., Reimund J., Lang J. i wsp.: *Mononuclear cell activation in Crohn's disease. Evaluation using serum assay of neopterin and interleukin-2 soluble receptors*. Gastroenterol Clin Biol, 1990, 14, 22-27.
176. Propst A., Propst T., Herold M. i wsp.: *Interleukin-1 receptor antagonist in differential diagnosis of inflammatory bowel diseases*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1995, 7, 1031-1036.
177. Nielsen O., Vainer B., Madsen S. i wsp.: *Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000, 95, 359-367.
178. Korczowski B.: *Prokalcytonina- przydatność diagnostyczna w pediatrii i neonatologii*. Rozprawa habilitacyjna. Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, 2004.
179. Tilg H., Montfrans C., Ende A. i wsp.: *Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces proinflammatory cytokine interferon γ* . Gut, 2002, 50, 191-195.
180. Rostropowicz- Denisiewicz K.: *Młdzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów w: Romicka A., Rostropowicz- Denisiewicz K. (red): Zapalne choroby reumatyczne w wieku rozwojowym*. PZWL, Warszawa, 2005, 71-88.

- 181.** Altindag Z., Sahin G., Inanici F. i wsp.: *Urinary neopterin excretion and dihydropteridine reductase activity in rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 1998, 18, 107-111.
- 182.** Schroecksadel K., Schirmer M., Duftner C. i wsp.: *Neopterin and the kynurenine per tryptophan ratio in serum of patients with rheumatoid arthritis*. Twenty-third International Winter-Workshop on Clinical, Chemical, and Biochemical Aspects of Pteridines, Pteridines 2004, 15, 45-73.
- 183.** Krause A., Protz H., Goebel K.: *Correlation between synovial neopterin and inflammatory activity in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1989, 48, 636-640.
- 184.** Eberhard O., Haubitz M., Brunkhorst F. i wsp.: *Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease and invasive bacterial infection*. Arthritis Rheum, 1997, 40, 1250-1256.
- 185.** Sauerland S., Hensler T., Bouillon B. i wsp.: *Plasma levels of procalcitonin and neopterin in multiple trauma patients with or without brain injury*. J Neurotrauma., 2003, 20, 953-960.