

ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XXXVI  
2006  
**SUPPLEMENT nr 2**



**Akademia Medyczna w Gdańsku**

**Barbara Kamińska**

**Wpływ wybranych mechanizmów etiopatogenetycznych  
wrzodziejącego zapalenia jelita grubego na ekspresję  
neurotransmiterów protekcyjnych w śluzówce  
i śródściennych zwojach jelita grubego u dzieci**

***The influence of some chosen etiopathogenetic mechanisms  
of the ulcerative colitis on the expression pattern  
of particular protective neurotransmitters  
within the colonic wall and intramural ganglia in children***

**Rozprawa habilitacyjna**

**Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej  
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Maria Korzon**

**Gdańsk 2006**

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY  
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD  
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY  
EDITORIAL BOARD  
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek  
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,  
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,  
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,  
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI  
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE  
Annales Academiae Medicae Gedanensis  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,  
80-210 Gdańsk, Poland  
e-mail: [annales@amg.gda.pl](mailto:annales@amg.gda.pl)

Artykuły opublikowane w Annales AMG  
są zamieszczane w bazie EMBASE  
Articles published In Annales AMG are covered  
by the Excerpta Medica dabase (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

## Podziękowania

Pragnę wyrazić wdzięczność wszystkim, którzy okazali mi pomoc i przyczynili się do powstania niniejszej pracy, a ich życzliwość i wyrozumiałość pozwalały przetrwać chwile zwątpienia we własne siły.

Grące podziękowania składam przynajmniej niektórym z Nich:

Pani Profesor Marii Korzon, Kierownikowi Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku, Mojemu Przyjacielowi, za zachętę do podjęcia niniejszej pracy, radę i pomoc podczas jej realizacji. Krytyczne uwagi Pani Profesor w ogromnej mierze przyczyniły się do nadania ostatecznej postaci i formy tej pracy.

Panu Profesorowi Mariuszowi Majewskiemu z Zespołu Fizjologii Klinicznej, Katedry Morfologii Funkcjonalnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za inspirację podjęcia wspólnych badań na zwierzętach, a następnie zachętę do zastosowania zdobytych doświadczeń u naszych pacjentów. Panu Profesorowi dziękuję za liczne, niezwykle cenne wskazówki i rady oraz za wielokrotne, stymulujące dyskusje. Dziękuję także Kolegom z Zespołu za współpracę w prowadzonych przeze mnie badaniach.

Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmieciowi z Zakładu Immunologii i Histologii Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Pani Doktor Juliannie Kurlendzie – Kierownikowi Zakładu Bakteriologii Klinicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku za okazaną bezinteresowną pomoc i życzliwość.

Koleżankom i Kolegom z Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku za wieloletnią współpracę, przyjaźń i wyrozumiałość.

Praca ta nie mogłaby nigdy powstać, gdyby nie wsparcie Moich Najbliższych, którym dziękuję, że otaczali mnie swoją miłością w tym trudnym dla mnie okresie pracy.



**Pamięci Mojej Matki Melanii  
pracę tę poświęcam**





## Spis treści

1. Wprowadzenie .....	11
2. Objaśnienie użytych skrótów .....	13
3. Uzasadnienie wyboru tematu .....	14
4. Wstęp.....	15
4.1. Nieswoiste zapalenia jelit .....	15
4.1.1. Definicja, etiologia .....	15
4.1.2. Epidemiologia nieswoistych zapaleń jelit .....	17
4.1.3. Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit.....	18
4.1.3.1. Czynniki genetyczne.....	19
4.1.3.2. Czynniki immunologiczne .....	19
Charakterystyka wybranych cytokin w IBD .....	21
Cytokiny prozapalne .....	21
Cytokiny przeciwzapalne .....	22
Interleukiny immunostymulacyjne .....	23
4.1.3.3. Czynniki środowiskowe .....	24
Czynniki infekcyjne – bakterie .....	24
Rola diety w IBD .....	30
Rola wolnych rodników tlenowych i tlenku azotu w patogenezie IBD .....	32
4.2. Jelitowy układ nerwowy (ENS – enteric nervous system).....	33
4.2.1. Historia.....	33
4.2.2. Organizacja i klasyfikacja ENS.....	35
4.2.2.1. Neurony ENS.....	38
4.2.2.2. Neurotransmitery protekcyjne ENS .....	40
Podział neurotransmiterów: .....	40
Galanina (GAL).....	42
Wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) .....	44
Peptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenyłową (PACAP).....	46
4.2.3. Zadania ENS w procesach fizjologicznych i patologicznych przewodu pokarmowego .....	47
4.2.4. Rola ENS w procesach zapalnych jelit.....	50
5. Cel pracy.....	53
6. Materiał i metody .....	55
7. Wyniki .....	63
8. Dyskusja .....	127
9. Wnioski .....	153
10. Streszczenie .....	154
11. <i>Summary</i> .....	161
12. Piśmiennictwo.....	168



## 1. Wprowadzenie

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC) jest coraz częściej rozpoznawaną jednostką chorobową u dzieci i młodzieży zarówno w Polsce jak i na świecie.

W ostatnich latach obserwuje się, że dotyczy ona coraz młodszych dzieci, a nawet niemowląt [103]. Coraz częściej również spotykamy się z przypadkami o bardzo ciężkim przebiegu, lekoopornością, kończących się koniecznością usunięcia jelita grubego.

Jak dotąd etiopatogeneza choroby nie jest wyjaśniona, stąd leczenie jest jedynie empiryczne. Rozpatruje się zaangażowanie procesów immunologicznych, genetycznych, bakteryjnych i innych w powstawaniu zmian w jelitach u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (IBD) [15, 26, 111, 198, 212].

W literaturze światowej ukazują się liczne doniesienia i spekulacje na temat ewentualnego głównego czynnika sprawczego choroby, którego ostateczne spreycyzowanie mogłoby pozwolić na wdrożenie leczenia przyczynowego [40, 176].

Burzliwy rozwój wiedzy medycznej w wielu dziedzinach, a szczególnie w zakresie genetyki, biologii molekularnej, neurobiologii, immunologii, farmakodynamiki, biotechnologii i innych, a także postęp w dziedzinach badawczych (endoskopia, techniki obrazowania etc.) pozwala na znacznie wcześniejsze ustalenie rozpoznania u wielu pacjentów. Nowoczesne metody diagnostyczne i terapeutyczne, zawsze z pewnym opóźnieniem są wprowadzane w pediatrii – dotyczy to również gastroenterologii.

Miniaturyzacja sprzętu, doskonałość metod anestezyjologicznych, pozwala ją na równie precyzyjną diagnozę w pediatrii, jak w klinice ludzi dorosłych.

Wszystkie te osiągnięcia pozwoliły w ostatnich latach na rozszerzenie liczby jednostek chorobowych, gdzie udało się ustalić dokładnie czynnik sprawczy i zastosować leczenie celowane z doskonałym skutkiem (infekcja *Helicobacter pylori*, niektóre postaci zapalenia wątroby, etc.).

Jak już wyżej wspomniano, etiopatogeneza IBD nadal nie jest ostatecznie wyjaśniona. Temu należy przypisać liczne niepowodzenia terapeutyczne.

W ostatnich latach notuje się jednakże pewien postęp w leczeniu zarówno choroby Leśniowskiego-Crohna (CD) oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC), co wiąże się z wprowadzaniem nowych terapii [9, 57, 69, 72, 77, 146, 162, 214, 219, 228, 232, 240].

Obecnie dysponujemy wieloma danymi dotyczącymi poszczególnych składowych procesu zapalnego w IBD, jednak sekwencja ich działania sprawczego nie jest do tej pory ustalona. Poszukiwanie kolejnych czynników etiologicznych nieswoistych zapaleń jelit zaowocowało szeregiem doświadczeń klinicznych, w tym poszerzaniu diagnostyki i wprowadzaniu nowych grup leków [26, 40, 96, 180, 235, 237, 253].

Prowadzone ostatnio intensywne prace badawcze dotyczą odpowiedzi na pytanie o zaangażowanie się jelitowego układu nerwowego (ENS) w trakcie

odpowiedzi zapalnej jelita na hipotetyczny patogen oraz rolę układu immunologicznego w różnych stadiach choroby.

Ocena aktywności i zakres działania ENS, a przede wszystkim analiza wszystkich, coraz szerzej poznawanych klas neuronów jelitowych, jego przekaźników (neurotransmiterów) w błonie śluzowej jelita opisywana jest głównie na modelach zwierzęcych. Doświadczalnymi zwierzętami są myszy, szczury, ptactwo, króliki i świnię. Zapalenie okrężnicy u zwierząt wywoływane jest najczęściej za pomocą kwasu trójnitrobenzenosiarkowego (TNBS) lub enterotoksyny A uzyskanej z *Clostridium difficile*, a niekiedy też formaliny [123, 167].

Dowodzono, że w przebiegu IBD zachodzą zmiany w ENS tak morfologiczne jak i funkcjonalne [50, 51, 70, 102, 173, 217].

Prace analizujące rolę jelitowego układu nerwowego w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u ludzi są nieliczne, a wnioski w nich zawarte, nie ostateczne, wymagające dalszych badań [83, 113, 115, 131, 222, 246].

Zapewne kolejne lata przyniosą szersze opracowania tych tak istotnych problemów, a tym samym przyczynią się do opracowania nowych możliwości w zakresie technik diagnostycznych i zweryfikują stosowane obecnie, jeszcze nie w pełni doskonałe metody terapeutyczne IBD.

## 2. Objaśnienie użytych skrótów

- ACh – acetylocholina (*acetylcholine*)
- 5-ASA – kwas 5-aminosalicylowy (*5-aminosalicylic acid*)
- CCK – cholecystokinina (*cholecystokinin*)
- CD – choroba Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's Disease*)
- CGRP – peptyd kodowany genem kalcytoniny przewód pokarmowy (*calcitonin gene-related peptide*)
- ENS – jelitowy układ nerwowy (*enteric nervous system*)
- IPAN – pierwotne wewnętrzne neurony aferentne (*intrinsic primary afferent neurones*)
- GAL – galanina (*galanin*)
- GI – przewód pokarmowy (*gastro-intestinal tract*)
- IBD – nieswoiste zapalenie jelit (*idiopathic bowel disease*)
- IBS – zespół jelita drażliwego (*idiopathic bowel syndrome*)
- IFN $\gamma$  – interferon gamma
- IL – interleukina (*interleukin*)
- IR – forma immunoreaktywna (peptydu) (*immunoreactive peptide*)
- LENK 5 – Leu<sup>5</sup>-enkefalina (*Leu<sup>5</sup>-enkephalin*)
- NO – tlenek azotu (*nitrogen oxide*)
- NOD2 – wewnątrzkomórkowy receptor peptydoglikanowy
- NOS – syntetaza tlenku azotu (*nitrogen oxide synthetase*)
- PACAP – peptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylową (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide inhibits*)
- RFT – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*)
- SOM – somatostatyna (*somatotropin release inhibiting hormone*)
- SRB – bakterie redukujące siarczany (*sulphate-reducing bacteria*)
- SUR – surowica krwi (*serum*)
- TNBS – kwas trójnitrobenzenosiarkowy (*trinitrobenzenesulphuric acid*)
- TNF $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów alfa (*tumor necrosis factor*)
- UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*)
- VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy (*vasoactive intestinal peptide*)
- ZM – zmienione miejsce w jelicie, z którego pobrano wycinek (*affected intestine where the biopsy was taken*)

### 3. Uzasadnienie wyboru tematu

Badania epidemiologiczne wykazują stały wzrost zachorowań na IBD wśród dzieci i młodzieży. Odnotowuje się przesunięcie momentu zachorowania nawet na okres wczesnego niemowlęctwa. Fakt ten mógłby przemawiać za pewną rolą procesów immunologicznych w etiopatogenezie IBD w wieku rozwojowym, biorąc pod uwagę słabą aktywność układu odpornościowego u małych dzieci.

Mimo znacznych osiągnięć jakie obserwuje się na drodze zmierzającej do ostatecznego ustalenia etiopatogenezy, nadal czynnik sprawczy nie jest ostatecznie zdefiniowany.

Potwierdzono uczestnictwo czynnika genetycznego (rodzinne występowanie choroby) oraz immunologicznego (zaangażowanie mechanizmów odpowiedzi komórkowej z udziałem limfocytów T). W literaturze ukazują się doniesienia o roli czynnika bakteryjnego w powstawaniu IBD.

Wszystkie wyżej wymienione fakty, jak również badania ostatnich lat sugerujące udział układu nerwowego przewodu pokarmowego, obok innych wyżej wymienionych czynników, w powstawaniu IBD (przy czym oparte są one głównie na badaniach eksperymentalnych) – stały się inspiracją do podjęcia badań w niniejszej pracy w nadziei, że być może staną się one pewnym wkładem w rozszerzenie wiedzy o etiopatogenezie i przyczynie niektórych objawów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, a także wybo-  
rze ukierunkowanej terapii.

## 4. Wstęp

### 4.1. Nieswoiste zapalenia jelit

#### 4.1.1. Definicja, etiologia

Etiologia i patogeneza nieswoistych zapaleń jelit (IBD) nie są do tej pory ostatecznie wyjaśnione. Wysiłki licznych naukowców pozwalają na coraz dokładniejsze poznanie procesów odpowiedzialnych za inicjację oraz podtrzymywanie zapalnych chorób jelit, jednak mimo to nadal wiele aspektów tych procesów pozostaje niewyjaśnionych. Przewlekłe, zapalne choroby jelita grubego, należące do grupy tzw. nieswoistych zapaleń jelit (IBD), obejmują dwie podstawowe postaci: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC) oraz chorobę Leśniowskiego-Crohna (CD). Trzecią grupę stanowią tak zwane atypowe postaci nieswoistego zapalenia jelit [5, 13, 14, 33, 128, 143, 188, 212].

Długotrwały przebieg nieswoistych zapaleń jelit, który znamionują naprzemienne okresy zdrowienia i nawrotów, występowanie groźnych powikłań, (m.in. wysokie prawdopodobieństwo rozwoju raka), zagrożenie resekcją jelita, a u dzieci dodatkowo upośledzenie rozwoju somatycznego sprawiają, iż poznanie mechanizmów powstawania i rozwoju tych chorób od wielu lat stanowi istotny problem badawczy [23, 111, 213, 217, 255].

Badaniom służą liczne próby stworzenia modelu zwierzęcego nieswoistych zapaleń jelit. Zwierzęce modele IBD, bądź to indukowane chemicznie, immunologicznie, inżynierią genetyczną czy spontanicznie, odgrywają główną rolę w wyjaśnianiu etiopatogenezy choroby u człowieka. Mimo, iż żaden z modeli zwierzęcych nie oddaje dokładnie przebiegu IBD u ludzi, to niewątpliwie przekazują one wiele ważnych informacji na temat patogenezy stanu zapalnego w jelicie [40, 102].

U zwierząt doniesienia dotyczą zarówno IBD występujących spontanicznie, jak i prowokowanych. Te ostatnie obejmują nie tylko prowokację czynnikami bezpośrednio wywołującymi zapalenie, ale i manipulacje genetyczne (na genach obecnych lub dodatkowo wprowadzonych). W przypadku zwierzęcych modeli z niedoborami odporności wykorzystuje się wiele genetycznie zmodyfikowanych szczepów myszy, które hodowane w odpowiednich warunkach prezentują zapalenie jelit [26].

Niektóre mysie czy szczurze modele zawierają mutacje dotyczące komórek CD4<sup>+</sup> lub zahamowania sekrecji cytokin. U myszy z niedoborem jednej z cytokin, immunostymulacyjnej interleukiny 2 (IL-2), która powoduje wzrost i rozwój limfocytów T, dochodzi do zapalenia całego jelita grubego (*pancolitis*), czego klinicznymi objawami są: krwawienia z dolnego odcinka przewodu pokarmowego, biegunka, wypadanie odbytu. W ba-

daniu anatomopatologicznym okrężnica jest znacznie pogrubiała, obecne są owrzodzenia. Z kolei u myszy z niedoborem cytokiny przeciwzapalnej, interleukiny 10 (IL-10), dochodzi do przewlekłego zapalenia jelit, rozrostu śluzówki, pogrubienia ściany jelita, zaburzonej struktury krypt i kosmków, a w blaszce właściwej stwierdza się znaczny naciek limfocytów, plazmacytów i histiocytów [225, 242].

Nieswoiste zapalenia jelit są chorobami przewlekłymi, mają charakter nawracający ze skłonnością do okresowych zaostrzeń i remisji. W trakcie ich trwania pacjent poddany jest licznym badaniom, w tym niejednokrotnie inwazyjnym. Terapia farmakologiczna jest długotrwała, często nie w pełni skuteczna, niejednokrotnie wywołuje skutki uboczne [239]. Wielokrotnie, ze względu na lekooporność oraz rozległość zmian niezbędne jest wykonanie zabiegu operacyjnego (proktokolektomia, pankolektomia). Również leczenie żywieniowe prowadzone w różnych modyfikacjach bywa przez pacjentów trudne do akceptacji [124, 218].

Pojawiają się także doniesienia o psychosomatycznych aspektach chorób przewodu pokarmowego, a w tym szczególnie nieswoistych zapalnych schorzeń jelit, które uznawano niegdyś za choroby z kręgu chorób psychosomatycznych.

Poddane analizie dane sugerują rolę, jaką odgrywa stan psychiczny w okresach nawrotów, remisji, a nawet w inicjacji nieswoistych procesów zapalnych w jelitach. Stres, jako ostre zaburzenie homeostazy ma zarówno długo – jak i krótkoterminowy wpływ na funkcjonowanie układu pokarmowego. Stres nasila przepuszczalność jelita, co może prowadzić do aktywacji mastocytów, degranulacji i uszkodzenia mucyny. Zaburzenia absorpcji wody i elektrolitów w jelicie pojawiają się w odpowiedzi na stres za pośrednictwem układu cholinergicznego. Związek między stresem i różnymi chorobami jelit, w tym chorobami czynnościowymi przewodu pokarmowego: IBS, odplywie żołądkowo-przełykowym oraz wrzodami trawiennymi jest przedmiotem badań. Wydaje się, że wykazanie związku między jelitem a czynnością ośrodkowego układu nerwowego może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne [4, 20, 39, 135, 138, 249]. Wraz z pogłębianiem wiedzy na temat etiopatogenezy tych jednostek chorobowych czynniki psychologiczne są mniej brane pod uwagę jako sprawcze. Odgrywają jednak istotną rolę w przebiegu IBD [104, 124].

Chociaż osiągnięcia w biotechnologii, immunologii i farmakologii zainicjowały szeroką gamę specyficznie działających nowych metod terapii w IBD, nie ma nadal całkowicie efektywnego, bezpiecznego i taniego leku [40, 92].

Trudno jest również uzyskać odpowiedź na pytanie, dlaczego u pewnej grupy chorych, pomimo prowadzonego według przyjętych standardów leczenia farmakologicznego, nie jesteśmy w stanie uzyskać remisji, co nieuchronnie prowadzi do konieczności wykonania zabiegu operacyjnego [115, 214].

Tak więc, wymienione powyżej fakty ukazują obraz ciężkiego i przewlekłego procesu chorobowego o niewyjaśnionej etiopatogenezie, jedno-



częściej trudno poddającego się leczeniu obecnie stosowanymi metodami terapeutycznymi

Na podstawie dotychczas opublikowanych prac eksperymentalnych, genetycznych, tworzenia modeli zwierzęcych, analizy aspektów klinicznych, farmakologicznych z zakresu badań nad etiopatogenezą IBD nie można w pełni ustalić zarówno pierwotnej przyczyny rozwoju tego schorzenia, jak i mechanizmów odpowiedzialnych za podtrzymywanie toczącego się w tkankach procesu zapalnego.

#### 4.1.2. Epidemiologia nieswoistych zapaleń jelit

Dążenia do wyjaśnienia zagadnienia występowania IBD inspirowane fakt, że jak już wspomniano, liczba zachorowań wzrasta na całym świecie i obejmuje coraz to młodszych pacjentów, co jest zjawiskiem wysoce niepokojącym.

Aspekty epidemiologiczne występowania nieswoistych zapaleń jelit poddano analizie w licznych publikacjach. Choroba ta występuje na całym świecie, jednak najwyższą zachorowalność na IBD stwierdza się na obszarach takich jak Europa Północna i Ameryka Północna, a w najnowszych doniesieniach odnotowano wzrost występowania tego schorzenia w krajach skandynawskich, w południowej Europie, Azji, Australii, oraz krajach latynoamerykańskich. Ostatnie dane mówią o 1,4 mln osób w Stanach Zjednoczonych i 2,2 mln chorych w Europie, u których rozpoznano IBD [5, 86]. Dobrze udokumentowany jest wzrost przypadków UC na świecie, największa zapadalność przedstawiona jest w USA – 38-229/100 tys i UK – 269/100 tys. W populacji polskiej, UC występuje częściej niż CD, podobnie w większości krajów europejskich [254].

Analizie poddano również częstość występowania IBD w różnych grupach etnicznych i stwierdzono najwyższy odsetek zachorowań wśród rasy białej, a zwłaszcza Żydów, nawet 4-krotnie wyższy niż u ciemnoskórych. Pomimo takich samych warunków socjalno-bytowych rasa biała częściej choruje na IBD w porównaniu z resztą populacji żyjącej na danym obszarze. Obserwuje się ponadto większą, nawet do 30% w porównaniu z pozostałą częścią danej populacji, zachorowalność na IBD wśród pozostałych członków rodzin chorych, zwłaszcza u krewnych pierwszego stopnia [5, 23, 64, 93, 101].

Wśród rodzin dotkniętych IBD obserwuje się zgodność co do typu choroby (tzn. w jednej rodzinie występuje albo UC albo CD). Stwierdzono także częstsze występowanie tej choroby u bliźniąt jednojajowych. Zgodność ta dla CD mieści się w granicach 42-58%, podczas gdy dla UC 6-17%. Dane te wskazują, że komponenta genetyczna ma znacząco większy udział w CD. Zgodność dla bliźniąt dwujajowych wynosi dla CD 4-12%, a dla UC 0-5% [22].

Z drugiej strony Hendrickson i wsp. podaje, że u zaledwie ok. 5% dzieci z IBD wywiad rodzinny wskazywał na występujące w rodzinie schorzenia

zapalne jelit. Nie stwierdzano różnic w zachorowalności ze względu na płeć badanych chorych [33, 101].

Ostatnio przeprowadzone badania wykazują większą częstotliwość zapadalności na IBD (głównie chorobę Leśniowskiego-Crohna) u mężczyzn i choroba ta rozwija się u nich w młodszym wieku niż to wykazano u kobiet. Niewyjaśniona jest również przewaga zachorowań chłopców we wczesnym okresie dzieciństwa na CD, podczas gdy zachorowalność u dziewcząt i chłopców na UC jest podobna [7, 86].

Wiek pacjentów, w którym notuje się najwyższą zachorowalność przypada na 2. i 3. dekadę życia. W około 15-25% przypadków choroba rozpoczyna się w dzieciństwie. W grupie dzieci i młodzieży około 10% z nich zostaje zdiagnozowanych przed 10 rokiem życia, 30% między 11-15 rokiem życia, a ponad 60% zachorowań przypada na grupę młodzieży i młodych dorosłych między 16-21 rokiem życia [25, 255].

Obecnie klasyczne postaci tego schorzenia rozpoznawane są już u dzieci w wieku przedszkolnym, a nawet u niemowląt. Hildebrand i wsp. ze Sztokholmu poddali analizie 152 dzieci w grupie wiekowej od 0-15 lat chorujących na IBD w latach 1990-2001 i stwierdzili, że częstotliwość zachorowań na CD w tym okresie znacznie wzrosła w porównaniu z zachorowaniami na UC i nieokreślone zapalenie jelit, a stosunek ten wyniósł 4,9:2,2:0,2 na 100 000 zachorowań [103].

Loftus sugeruje w swoim doniesieniu, że do niedawna wyraźnie zaznaczone różnice rasowe i etniczne w aspekcie epidemiologii IBD zaczynają zanikać, a zmiana ta sugeruje, że występowanie nieswoistych zapaleń jelit znacząco modyfikowane jest przez czynniki środowiskowe [151].

Aktualnie w Polsce przez liczne ośrodki kliniczne prowadzone są badania epidemiologiczne, w których poddaje się analizie występowanie IBD w poszczególnych regionach kraju. Wstępne doniesienia potwierdzają wzrost zachorowalności, szczególnie na UC i inne niespecyficzne zapalenia jelit, a dotyczy to szczególnie terenu Polski Północnej [136].

### **4.1.3. Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit**

Powstanie i utrzymywanie się stanu zapalnego ściany jelita jest efektem wzajemnego oddziaływania na siebie czynników: prozapalnych (agresywnych), regulujących homeostazę błony śluzowej jelita oraz czynników protekcyjnych.

Do czynników prozapalnych zalicza się przede wszystkim: bakterie jelitowe, kwasy żółciowe, enzymy trawienne, lipopolisacharydy i peptydoglikany.

Nieprzepuszczalna bariera śluzówkowa, śluz jelitowy, sekrecyjne immunoglobuliny, niektóre prostaglandyny i interleukiny oraz glutamina, somatostatyna, kortyzol i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe to główne czynniki protekcyjne.

Natomiast do czynników modyfikujących homeostazę błony śluzowej należą uwarunkowania genetyczne odpowiedzialne za immunoregulację i czynność bariery śluzówkowej oraz rozliczne czynniki środowiskowe (dieta, palenie tytoniu, zakażenia, stres, antybiotyki i inne leki) [6, 116, 212].

#### 4.1.3.1. Czynniki genetyczne

Predyspozycje rodzinnego występowania nieswoistych zapaleń jelit, w szczególności w przypadku choroby Leśniowskiego-Cohna, uwarunkowania rasowe, a także podobieństwo z chorobami o podłożu autoagresji (*oligoarthritis*, *arthritis enteropathica*, *spondylitis ancylopoetica*) wskazuje na podłoże genetyczne i oczywistym jest stwierdzenie, że czynniki genetyczne mają niezaprzeczalny udział w patogenezie IBD [3].

Stwierdzono, że genom zlokalizowany w odpowiednich regionach chromosomów 2 i 6 odpowiada za predyspozycje do rozwoju UC. Udział chromosomu 6 może mieć miejsce również w patogenezie CD. W chromosomach 3, 7 i 12 lokalizują się genomy zarówno dla CD jak i dla UC. Z chorobą Leśniowskiego-Crohna związana jest również mutacja genu NOD2 na chromosomie 16 [26, 91, 182,]. Ciekawym wydaje się spostrzeżenie, że u pacjentów z wariantem mutacji Pro268Ser stwierdza się znamienne wyższą częstość konieczności interwencji chirurgicznej, a także współwystępowaniem IBD oraz nowotworów jelita grubego wśród krewnych pierwszego stopnia. Genetyczny polimorfizm w przypadku choroby Crohna może okazać się przydatny w określeniu klinicznej, związanej z umiejscowieniem zmian chorobowych w jelicie, postaci zapalenia jelita grubego [42, 162, 230].

Czynniki genetyczne są współodpowiedzialne za pierwotne uszkodzenie błony śluzowej jelita i prowadzą w efekcie do zmiany jej czynności. Wydaje się również istotne spostrzeżenie, że u osobników podatnych genetycznie na te schorzenia mamy do czynienia z nieprawidłową odpowiedzią układu odpornościowego na skład nawet prawidłowej flory jelitowej [3, 11, 26].

Dlatego nadal dąży się do dalszej identyfikacji genów wskazujących na predyspozycje do występowania IBD, co pozwoli lepiej zrozumieć etiologię tych chorób.

#### 4.1.3.2. Czynniki immunologiczne

Choć etiologia IBD nadal jest niejasna, to wiadomo już, iż do niekwestionowanych czynników biorących udział w ciągu zdarzeń patogenetycznych w IBD należą zaburzenia immunoregulacji. Obecnie podkreśla się ogromną rolę regulacyjną cytokin, które są odpowiedzialne zarówno za indukowanie, regulowanie oraz ograniczanie procesu zapalnego. Ponadto wpływają one na proces gojenia i regeneracji zmienionych chorobowo tkanek [90, 129, 205].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat stwierdzono, iż te aktywnie biologicznie białka wydzielane są nie tylko przez aktywowane monocyty/makrofagi,

limfocyty i granulocyty, ale także przez szereg innych komórek, w tym komórki zmienionego zapalnie nabłonka przewodu pokarmowego.

Stwierdzenie w surowicy krwi przeciwciał przeciwko antygenom komórek śluzówki okrężnicy a także obecność zwiększonej ilości granulocytów obojętnochłonnych, limfocytów i makrofagów w błonie śluzowej jelita pacjentów z IBD może stanowić dowód i potwierdzać mechanizm odpowiedzi immunologicznej w tym schorzeniu.

W procesy immunologiczne w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit zaangażowane są mechanizmy odpowiedzi komórkowej z udziałem limfocytów T. W IBD dochodzi do aktywacji komórek T pomocniczych (Th) o fenotypie CD4+8-, oraz komórek T cytotoksycznych (Tc) o fenotypie CD4-8+. Wydzielane przez nie cytokiny biorą udział między innymi w procesach rozpoznawania antygeny, a nie, jak uważano do tej pory, tylko w determinowaniu funkcji pomocniczej lub cytotoksycznej limfocytów [93, 145, 226].

Limfocyty T pomocnicze (Th), odpowiedzialne pod względem czynnościowym za formę odpowiedzi komórkowej dzielą się na subpopulację Th1 (działającą pomocniczo w odpowiedzi typu komórkowego) i Th2 (wspierającą odpowiedź humoralną realizowaną przez limfocyty B).

Limfocyty Th1 produkują cytokiny prozapalne: interleukinę 2 (IL-2), która stymuluje cytotoksyczność limfocytów oraz interferon gamma (IFN $\gamma$ ), który aktywuje szereg komórek uczestniczących w odpowiedzi swoistej i nieswoistej.

Subpopulacja limfocytów Th2 produkuje interleukinę 4 (IL-4), interleukinę 5 (IL-5), interleukinę 10 (IL-10) i interleukinę 13 (IL-13), które są czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B.

Limfocyty Th3 wykazują swoją aktywność supresorową w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego, wydzielają one duże ilości TGF $\beta$  oraz interleukiny 10 (IL-10) i stanowią grupę komórek hamujących odpowiedź immunologiczną.

Wykazano, że ekspresja cytokin w błonie śluzowej jelita chorych na UC oraz na CD ulega różnym zmianom w zależności od postaci choroby, jej fazy rozwoju oraz od rodzaju cytokiny. Końcowy rezultat odpowiedzi immunologicznej w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit zależy od zaburzeń dynamicznej równowagi pomiędzy aktywnością cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), przeciwzapalnych (IL-4, IL-10) oraz interleukin immunomodulacyjnych (IL-2, IL-5, IL-12, IL-18), a wynikiem tego procesu jest rozwój zmian miejscowych w IBD [26, 114, 130, 177, 226, 259, 260].

Mniejszy udział w procesie etiopatogenezy IBD przypisuje się limfocytom B, wiadomo jednak, że szczególnie limfocyty B1 uczestniczą głównie w odpowiedzi pierwotnej. Wytwarzane przez nie naturalne przeciwciała należą do pierwszej linii obrony przeciw mikroorganizmom. W procesie tym na terenie błony śluzowej jelita, biorą udział komórki plazma-

tyczne, które wytwarzając IgA i IgE, uczestniczą w odpowiedzi skierowanej przeciwko antygenom ścian bakterii i ich toksynom.

## Charakterystyka wybranych cytokin w IBD

### Cytokiny prozapalne

Interleukina 1 (IL-1) jest wydzielana przez makrofagi i monocyty z różnych tkanek, a czynnikiem indukującym jej wydzielanie są lipopolisacharydy, które stanowią główny składnik błon komórkowych bakterii Gram ujemnych, egzotoksyny oraz peptydoglikany, które są produktami mikroorganizmów. IL-1 pobudza wytwarzanie IFN $\gamma$  i IL-6. Cytokina ta wzmacnia rozwój reakcji zapalnej przez przyciąganie neutrofilów i monocytów do ogniska zapalnego, wzmacnia uwalnianie histaminy i przepuszczalność śródbłonnków naczyń, stymuluje wytwarzanie PDGF (płytkopodobny czynnik wzrostu) [79, 130]. IL-1 wydaje się mieć istotne znaczenie w patogenezie IBD – stwierdza się jej podwyższony poziom w jelicie u chorych z IBD. Aktywność IL-1 jest częściowo determinowana poziomem antagonisty receptora IL-1 (IL-1RA), który konkuruje z IL-1 co do wiązania receptora. Są dowody na zaburzenia wydzielania IL-1 i IL-1RA w błonie śluzowej jelita w przebiegu IBD [61].

Interleukina 8 (IL-8) jest silną chemokina i działa chemotaktycznie oraz aktywująco na populację limfocytów. Jej wydzielanie wspomaga IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ . Najważniejszą jej funkcją jest przyciąganie neutrofilów do miejsca zapalenia i pobudzenie ich do działania bakteriobójczego. Wykazano, że wydzielające metaloproteinazę enterotoksynogenne *Bacteroides* mogą powodować ostrą odpowiedź zapalną w śluzówce jelita, a u królików może wystąpić śmiertelna biegunka krwotoczna. W badaniach Wu potwierdzono, że pobudzenie produkcji IL-8 zależy od biologicznej aktywności tej bakterii. Indukcja mRNA dla IL-8 występuje gwałtownie i szybko maleje (w 6 godzin), zaś sekrecja białka IL-8 narasta przez 18 godz. [80, 259].

Czynnik martwicy nowotworów alfa (tumor necrosis factor-TNF $\alpha$ ), poznany został jako białko zdolne do zabijania komórek nowotworowych *in vitro*. Badania doświadczalne wykazały, że poza tym białkiem istnieje kachektyna, białko odpowiedzialne za procesy wyniszczenia i jest w swojej budowie identyczna z białkiem TNF. Nadano im wspólną nazwę TNF $\alpha$ . Kolejne zidentyfikowane białko to limfotoksyna nazwana TNF  $\beta$ . Kolejna limfotoksyna o podobnej z kolei budowie do TNF  $\beta$  określona została jako limfotoksyna beta (LT $\beta$ ) [79].

TNF  $\alpha$  jest jedną z najważniejszych cytokin biorących udział w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami zaangażowanymi w odpowiedź immunologiczną, a innymi komórkami, w zjawisku apoptozy, w metabolizmie komórkowym, reakcjach zapalnych i fibrynolitycznych. Wzrost ekspresji genu TNF $\alpha$  jest jednym z czynników zwiększających ryzyko wystąpienia IBD. TNF $\alpha$  wytwarzany jest głównie przez monocyty i makrofagi, a głównym bodźcem do jego wytwarzania są lipopolisacharydy ścian komórek bak-

teryjnych, które indukują ekspresję genu TNF $\alpha$ . W błonie śluzowej prawidłowego jelita TNF $\alpha$  występuje wyłącznie w nieznacznej liczbie komórek, podczas gdy w colitis ulcerosa i w chorobie Leśniowskiego-Crohna liczba komórek zawierających TNF $\alpha$  wyraźnie wzrasta [79, 130, 238].

Breese i wsp. W badaniach immunohistochemicznych obserwowali częstsze występowanie TNF $\alpha$  w komórkach błony śluzowej jelita u dzieci chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego [29, 260].

Uważa się, że w IBD TNF $\alpha$  odpowiedzialny jest również za migrację komórek zapalnych, aktywację procesu krzepnięcia oraz formowanie się ziarniniaków zapalnych w chorobie Crohna. Znaczenie TNF $\alpha$  w IBD potwierdzają wyniki terapii przeciwciałami anty-TNF $\alpha$  w sterydoopornych postaciach tych chorób [26, 61, 87, 92, 130, 186].

Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) jest cytokiną o charakterze prozapalnym, o bardzo szerokim spektrum działania, a wzrost jego syntezy obserwowano w wielu przewlekłych procesach zapalnych, takich jak choroba reumatyczna, CD oraz w UC. Uszkodzenie jelita wiąże się ze zwiększoną sekrecją IFN $\gamma$ . Jego ekspresję stymuluje IL-1, IL-2 i TNF $\alpha$ . Gołąb i wsp. podaje, że jest to najsilniejszy aktywator makrofagów i pobudza je do wytwarzania reaktywnych form tlenu. Wzrost poziomu mRNA IFN $\gamma$  w błonie śluzowej chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Crohna sugeruje możliwość terapeutycznej interwencji poprzez neutralizację lokalnie wydzielanego interferonu gamma [79, 238].

### **Cytokiny przeciwzapalne**

Interleukina 10 (IL-10) odgrywa szczególną rolę w regulowaniu prawidłowej funkcji błony śluzowej jelita [79]. Wiadomo, że inaktywacja genu dla IL-10 u myszy prowadzi do przewlekłego zapalenia jelit, a tym samym stanowi dowód na przeciwzapalną rolę tej cytokiny. Wcześniejsze badania pokazały, że bakterie, przyczepione dzięki IL-10 u myszy pozbawionych genu dla IL-10 inicjują enterocolitis już w okresie noworodkowym [238]. Brak tolerancji na antygeny bakteryjne zdaje się wynikać z nieobecności IL-10 w czasie ekspozycji na bakterie. Bezbakteryjne, tzw. Gram free (GF) i pozbawione IL-10 myszy rozwijają colitis po skolonizowaniu normalnymi bakteriami jelitowymi [225, 237]. U myszy z niedoborem IL-10, hodowanych w normalnych warunkach, dochodzi do przewlekłego zapalenia jelit. Charakterystyczne są tu: intensywny rozrost regeneracyjny śluzówki prowadzący do pogrubienia ściany jelita, niewłaściwa budowa krypt i kosmków, znaczny naciek limfoplazmocytów i histiocyotów w blaszce właściwej i warstwie podśluzowej [101]. In vitro IL-10 wykazuje potencjalne działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne. W patogenezie IBD obserwowano zarówno obniżoną jak i podwyższoną ekspresję mRNA IL-10 w błonie śluzowej oraz wzrost aktywności tej cytokiny w surowicy krwi [101].

Najnowsze dane wskazują, że terapia CD rekombinowaną ludzką IL-10 (rHuIL-10) jest bezpieczna i może indukować kliniczną i endoskopową remisję [47].

### **Interleukiny immunostymulacyjne**

Interleukina 12 (IL-12) – wytwarzana jest przez makrofagi i komórki dendrytyczne prezentujące antygen. Bezpośrednio jej wydzielanie pobudzają składowe ściany komórkowych bakterii. IL-12 działa na limfocyty T i komórki NK wzmagając ich cytotoksyczność i proliferację oraz wytwarzanie przez nie IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  [79, 130].

Pewne dane wskazują na znaczną rolę IL-12 w rozwoju IBD oraz, że IL-12 wpływa na zapalenie zarówno poprzez mechanizmy zależne i niezależne od IFN $\gamma$  [169]. Interleukina 18 (IL-18) swoją strukturą przypomina IL-1, natomiast jej funkcja jest podobna do funkcji IL-12. Wytwarzana jest głównie przez makrofagi, indukuje wytwarzanie IFN  $\gamma$  i IL-2, wzmacnia cytotoksyczność limfocytów T CD4+, 8+, oraz komórek NK. Jej rola w prawidłowej i zaburzonej funkcji układu odpornościowego przewodu pokarmowego nie została jeszcze bliżej określona. Wiadomo, że indukuje ona syntezę cytokin prozapalnych – IFN $\gamma$  oraz TNF $\alpha$ , które mają zasadnicze znaczenie w patogenezie IBD [170].

IL-18 wydzielana jest w postaci nieaktywnej (pro-IL-18), zaś aktywacja tej cząsteczki następuje w wyniku działania kaspazy 1, tej samej, która aktywuje pro-IL-1. Ponadto komórki błony śluzowej jelita wydzielają białko wiążące IL-18 (IL-18-BP), którego poziom decyduje o ostatecznym poziomie aktywności biologicznej tej cytokiny [79, 200].

Chociaż IL-18 badano intensywnie zarówno na ludzkim modelu IBD jak i na myszach, nie określono jednoznacznej jej funkcji w indukcji ani w trakcie przewlekłych chorób zapalnych jelit [114]. Precyzyjne określenie jej udziału w patogenezie IBD wciąż jest tematem otwartym. W świetle ostatnich obserwacji wynika, że czynnik transkrypcji NF- $\kappa$ B ma zdolność regulacji funkcjonalnej aktywności IL-18 oraz, że ma wpływ na ciężkość choroby poprzez zmianę ekspresji swoistego dlań endogenego inhibitora – białka wiążącego IL-18 (wykazano to w modelu świńskim colitis) [203].

W UC dominują subpopulację Th2 produkujące interleukiny 4 i 10 – cytokiny przeciwzapalne [19]. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego stwierdza się ponadto zwiększoną syntezę cytokin immunomodulacyjnych – IL-5, IL-12 i IL-18. Także limfocyty obecne w blaszce właściwej produkują IL-12. UC charakteryzuje mieszany typ odpowiedzi komórkowej o cechach aktywacji zarówno limfocytów Th1 jak i Th 2, zwiększoną syntezą TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  – cytokin o charakterze prozapalnym [177].

W chorobie CD przeważa odpowiedź typu komórkowego Th1 i występuje zwiększona synteza interferonu gamma (IFN $\gamma$ ), czynnika martwi-

cy nowotworów alfa (TNF $\alpha$ ), oraz IL-12. IL-18-cytokin związanych z limfocytami Th1 oraz produkcją IFN $\gamma$  [130].

#### 4.1.3.3. Czynniki środowiskowe

Ze względu na stały wzrost zachorowalności i obniżanie się wieku zachorowania na nieswoiste zapalenia jelit, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych, przypisuje się coraz częściej dominującej roli czynników środowiskowych w etiopatogenezie IBD.

Czynniki środowiskowe, a przede wszystkim bakteryjna flora jelitowa, dieta, związki chemiczne zawarte w pożywieniu i otoczeniu człowieka, palenie tytoniu odgrywają rolę w etiopatogenezie IBD [116]. Uważa się, że czynniki środowiskowe mają wpływ na rodzaj flory bakteryjnej jelita. Wymienia się wśród nich rodzaj porodu, kolonizacje jelita i dróg rodnych matki, karmienie piersią, bakterie szpitalne, stan higieny. Większość badań neonatologicznych pokazuje, że kolonizacja jelita zachodzi gwałtownie po urodzeniu. Inne ważne pytanie dotyczy czasu, w jakim flora jelita pacjentów z IBD staje się nieprawidłowa.

Działanie czynników środowiskowych jest wielokierunkowe. Mogą one wywierać swój niekorzystny wpływ bezpośrednio na barierę śluzówkową jelita oraz modulując skład śluzu jelitowego. Są one również współodpowiedzialne za wystąpienie IBD w przypadkach genetycznie uwarunkowanych zaburzeń prowadzących do nadprodukcji cytokin prozapalnych lub upośledzonej syntezy cytokin regulujących homeostazę błony śluzowej jelita [114, 241].

Jedynie, co nie budzi wątpliwości, to fakt, że badania kliniczne i laboratoryjne wskazują jednoznacznie na rolę czynników genetycznych i środowiskowych [149]. Bezsporna wydaje się także teoria, według której w patogenezie IBD dochodzi do reakcji autoimmunologicznej w stosunku do antygenów błony śluzowej jelita i świadczy o odpowiedzi immunologicznej na antygeny flory jelitowej, lub na zakażenie dotyczące tkanki jelitowej, czego następstwem jest przewlekły, niszczący wpływ odpowiedzi zapalnej skierowanej przeciwko auto-antygenom takim jak mucyna, komórki kubkowe, kolonocyty i inne [3, 11, 15].

Ostatnie doniesienia nie sugerują specyficznej, przetrwałej infekcji jako przyczyny IBD, ale wskazują, że patogeny jelitowe mogą inicjować zmiany początkowe IBD i wiązać się z reaktywacją bezobjawowej postaci choroby. Mimo samoograniczającego się charakteru zmian w jelicie, infekcje inicjują kaskadę zapalnych zdarzeń prowadząc do przewlekłej, nawracającej choroby u genetycznie predysponowanych osobników [193, 236].

#### Czynniki infekcyjne – bakterie

Do chwili obecnej z kału zdrowego człowieka udało się wyodrębnić ponad 400 gatunków bakterii, z czego powyżej 99% stanowią bakterie



beztlenowe. Przewód pokarmowy w momencie urodzenia jest jałowy, a kolonizacja drobnoustrojami rozpoczyna się po ok. 4 godz. od chwili narodzin. Rodzaj bakterii i ich lokalizacja zmienia się z wiekiem, stanem zdrowia i rodzajem stosowanej diety [85, 118, 158, 241].

Mikroorganizmy jelita, tak u zdrowych jak i chorych osobników, odgrywają ważną rolę fizjologiczną. Duży potencjał metaboliczny tych organizmów ma wpływ na jelito grube, głównie poprzez zdolności do produkcji związków hamujących lub niszczących drobnoustroje nie będące składnikiem flory jelitowej. W śluzie, w błonie śluzowej czy w samym świetle jelita występuje wiele gatunków bakterii. Relacje pomiędzy gospodarzem, a komórką bakteryjną w warunkach fizjologicznych mają charakter symbiotyczny o różnym stopniu zaawansowania. Bakterie czerpią energię z dostarczanych z pokarmem związków, a rozkładany przez nie maślan staje się substratem energetycznym dla nabłonka jelita. Źródłem energii dla bakterii są wodorowęglany, a ich metabolizm jest bardzo istotny, gdyż większość mikroorganizmów ma zdolność rozkładania sacharozy. Ilość i rodzaj produktów fermentacji zależy od dostarczanych substratów i ich struktury, składu a także rodzaju fermentacji. Rozkład białek i niewłaściwy metabolizm aminokwasów prowadzi do tworzenia licznych toksycznych metabolitów, w tym fenoli, indolu, amin. Hamują one rozwój mikroorganizmów, poprzez fermentacje wodorowęglanów. W dystalnym jelicie gdzie dostępność wodorowęglanów jest ograniczona, procesy te mają tym większe znaczenie [117, 148].

Przyjęty za powszechny termin *prawidłowa flora jelitowa* oznacza, że z badanego materiału nie izoluje się drobnoustrojów patogennych lub potencjalnie patogennych. W warunkach zdrowia komensalne bakterie jelita dostarczają wielu substancji odżywczych dla nabłonka jelita. W przypadku zmian w składzie flory bakteryjnej jelita może dochodzić do zmiany stosunków ilościowych i dominacji szczepów potencjalnie patogennych. Bakterie komensalne, takie jak *E. coli*, mogą się transformować do patogenów jeśli nabeżdą materiał genetyczny kodujący cechy wirulencji takie jak adhezyny, enterotoksyny, inwazyjny i cytokiny [68].

Wśród czynników etiologicznych IBD znaczącą rolę przypisuje się bakteriom obecnym w świetle jelita [149, 206, 207, 221].

W ostatnich latach, rosnąca liczba danych wskazuje na znaczenie komensali jelitowych w patogenezie IBD. W procesie zapalnym obecność bakterii komensalnych jelita zdaje się być niezbędna do rozwoju choroby. Badania sugerują, że colitis może wynikać z utraty tolerancji układu immunologicznego wobec bakterii. Zjawisko tolerancji jest niezbędnym procesem fizjologicznym dla prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Uważa się, że utrata tolerancji w stosunku do bakterii jelitowych prowadzi do IBD.

Niekontrolowana aktywacja układu immunologicznego przeciwko bakteriom komensalnym wydaje się być odpowiedzialna za przewlekłość tej choroby. Bakterie jelitowe mają wpływ na trzy podstawowe funkcje jakie w stanie fizjologicznym pełni nabłonek jelitowy, a mianowicie zmieniają strukturę bariery jelitowej, indukują wydzielanie elektrolitów i aktywują kaskadę zapalną [18, 88].

Sartor i Lodes uważają, że CD, UC i *pouchitis* spowodowane są nadmierną, agresywną odpowiedzią immunologiczną na antygeny bakterii jelitowych, zachodzącą u predysponowanych genetycznie osobników. Badania kliniczne i eksperymentalne sugerują, że względna równowaga pomiędzy działaniem agresywnym i ochronnym szczepów bakteryjnych jest zaburzona w tych schorzeniach [150, 219].

Mimo dużej liczby bakterii kolonizujących światło jelita, wiele badań wykazało, że w normalnych warunkach, błona śluzowa przeważnie wolna jest od bakterii zdolnych do przylegania do śluzówki jelita. Jednakże stwierdzono również, że duża liczba antygenów bakteryjnych związana jest ze śluzówką jelita w IBD. Obecność bakterii jelitowych jest niezwykle istotnym elementem badawczym na modelach zwierzęcych colitis. Wykazano na tych modelach zmniejszenie objawów klinicznych i histologicznych, jeśli zwierzęta hodowane były w środowisku wolnym od bakterii.

Sydora i wsp., wykazali, że u myszy pozbawionych IL-10 lub IL-2 i przebywających w środowisku aseptycznym nie występowały kliniczne objawy zapalenia jelit. Po umieszczeniu myszy w otoczeniu normalnej flory bakteryjnej rozwijało się zapalenie jelit. Modele zwierzęce wyraźnie sugerują, że antygeny pochodzące od bakterii jelitowych mogą prowadzić do rozwoju IBD [61, 238].

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych pozwalają przypuszczać, że flora jelitowa odgrywa rolę w procesach inicjacji i utrzymywania procesu zapalnego w jelicie. Stwierdzono, że w modelach zwierzęcych, antybiotyki o szerokim spektrum działania zmniejszają ilość bakterii i działają przeciwko procesowi zapalnemu w jelitach. Kilka gatunków bakterii występujących w normalnej mikroflorze wraz z beztlenowcami, jest zdolnych do przejawiania działania inwazyjnego w przypadku dysfunkcji bariery śluzówkowej okrężnicy. Większość bakterii tlenowych wywołuje ogniskowe zmiany objęte ostrym procesem zapalnym, natomiast niektóre beztlenowce powodują rozległą fibrogenną odpowiedź obejmującą całą ścianę jelita [88].

Śluzówka jelita pacjentów z IBD może wykazywać zmiany pozwalające na większe przyleganie bakterii i wówczas infekcje jelita zaczynają się zazwyczaj poprzez przyczepienie się komórki bakterii do komórki gospodarza. Bliższy kontakt bakterii ze śluzówką może być kluczową komponentą w inicjacji sekwencji zapalenia oraz zmian przepuszczalności jelit, charakterystycznych dla IBD. Czynniki genetyczne mogą współtowa-

rzyszyć zarówno zwiększonej penetracji bakterii, lub ich produktów, jak i nasilać odpowiedź zapalną [101, 110, 162, 174, 184].

Udowodniono, że zaburzenie równowagi pomiędzy fizjologiczną i patogenną florą bakteryjną jest odpowiedzialne za wywołanie miejscowego stanu zapalnego jelita. Uznając dysbiozę za kluczowy element w patogenezie IBD, być może istotne jest pytanie o jej źródło. Uważa się, że czynniki genetyczne mają wpływ na florę jelitową. Zmiany flory kałowej stwierdzono także u zdrowych krewnych osób cierpiących na IBD, co sugeruje że może być to priorytetowym czynnikiem ryzyka rozwoju IBD. Niemniej bliscy krewni dzielą to samo środowisko, stąd współdziałanie czynników środowiskowych i genetycznych na florę jelita nie jest jasny. Czy dysbioza jest zjawiskiem wtórnym w IBD czy też jest czynnikiem sprawczym procesu zapalnego? Dane uzyskane z badań nad zwierzętami sugerują, że fenotyp immunologiczny gospodarza może silnie wpływać na skład mikroflory jelita.

Sugerowano, że profil bakterii jest stały w ciągu życia, ale rodzaj diety, nowoczesne żywienie niemowląt, stosowanie antybiotyków mogą faworyzować wzrost potencjalnie patogennych gatunków bakterii kosztem komensali [241].

Nie wiadomo, jakie bakterie jelitowe są zaangażowane w patogenezę IBD.

Niektórzy badacze wskazują na beztlenowce, takie jak bakterie z rodzaju *Bacteroides* czy *Clostridium*, którym przypisuje się kluczową rolę w etiopatogenezie nieswoistych zmian zapalnych jelit. Szczepy *Bacteroides* i *Clostridium* produkują enterotoksyny i/lub mają własności proteolityczne, co zwiększa przepuszczalność jelita. Wśród nich dużo uwagi poświęca się *Bacteroides fragilis*, który jest często izolowany u chorych na wrzodziejące zapalenia jelita grubego. W chwili obecnej nie wiadomo, czy bakteria ta jest czynnikiem inicjującym, czy podtrzymującym proces zapalny [81, 117, 149, 206, 207].

Jak już wyżej wspomniano, niedobór IL-10 u myszy prowadzi, w normalnych warunkach, do rozwoju colitis, czego nie obserwuje się w środowisku wolnym od bakterii. W literaturze znajdują się dane o zwiększonej liczbie przylegających do śluzówki bakterii *Clostridium* w okresie poprzedzającym ujawnienie colitis [11, 32, 100].

Liczne badania odnotowują w trakcie procesu zapalnego w jelitach redukcję bakterii potencjalnie korzystnych jak *Bifidobacteria* w CD, UC i *pouchitis* [241].

Wiadomo, że elementy ściany komórkowej bakterii, jak liposacharydy i inne produkty bakteryjne, mają silne działanie prozapalne. Co więcej, w jednym z doniesień dotyczących prac eksperymentalnych na zwierzętach stwierdzono, że bakterie wzbudziły hiperplazję śluzówki oraz odpowiedź Th. NOD2 bierze udział w transmisji sygnału aktywowanej przez lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych. Uszkodzona aktywność genu NOD2 może zmniejszać zdolność jelita do eliminacji bakterii. Te dane sugerują, że interakcja pomiędzy bakteriami Gram-ujemnymi i odpowiedzią jelitowego układu immunologicznego jest krytycznym elementem

w patogenezie UC, a szczególnie w CD. Pomimo tych obserwacji, stwierdzono ostatnio, że populacja japońskich pacjentów z CD nie posiadała wariantów genu NOD2, co sugeruje potrzebę dalszych badań nad jego polimorfizmem [184].

Należy pamiętać, że także inne bakterie chorobotwórcze mogą brać udział w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit. Kliniczne i histologiczne objawy IBD pod wieloma względami przypominają zakażenia wywołane przez znane patogeny. CD może przebiegać jak infekcja wywołana przez *Yersinia* lub prątek gruźlicy. Zakażenie *Shigella* lub *Campylobacter* mogą ludzko przypominać UC. Obserwacje te mogą zbliżyć do wyjaśnienia mechanizmu procesów toczących się w jelicie [101].

Wciąż brana jest pod uwagę infekcja *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, a zwłaszcza *Mycobacterium paratuberculosis*, głównie w patogenezie IBD. Ten ostatni prątek został wyizolowany od niektórych pacjentów z CD, a badania wykazały we krwi podwyższone miano p/ciał wobec tych drobnoustrojów. Niemniej, kliniczne oraz immunohistochemiczne badania nie udowodniły roli prątków w patogenezie CD [6, 48, 100, 184].

Być może zrozumienie złożonych interakcji między gospodarzem a komensalami i patogenami pomoże znaleźć drogi zapobiegania i postępowania w chorobach jelit, które wynikają z zaburzenia równowagi pomiędzy nimi. Powyższe doniesienia sugerują, że wśród licznych mikroorganizmów jelitowych może znajdować się patogen odpowiedzialny za rozwój IBD.

Wobec powyższego szczególnego znaczenia nabiera fakt, że metabolizm bakterii znajdujących się w obrębie jelita różni się znacznie od metabolizmu komórek gospodarza.

Podstawowa różnica wynika przede wszystkim z tego, że w obecności tlenu w komórkach ssaków znaczne ilości energii dostarcza metabolizm węglowodanów, zaś końcowymi produktami przemiany materii są: dwutlenek węgla i woda. Natomiast w warunkach beztlenowych organizmy bakteryjne, zasiedlające jelito grube, wprawdzie poddają również procesom fermentacyjnym węglowodany takie jak: skrobia, polisacharydy pochodzenia roślinnego, mukopolisacharydy włókien mięsnych, lecz różne są końcowe produkty tej przemiany. W rezultacie powstaje energia, oraz końcowe metabolity, takie jak: krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz gazy jelitowe [119].

Zagadnienie przemiany gazowej zachodzącej w jelicie wiąże się ściśle z produkcją siarkowodoru przez bakterie beztlenowe. *Bacteroides fragilis* produkujący H<sub>2</sub>S, stwierdza się w świetle jelita grubego dzieci z IBD, zwłaszcza o umiarkowanym i ciężkim przebiegu. Wiadomo, że istnieją szczepy tego gatunku, które posiadają zdolność wytwarzania enterotoksyn tzw. enterotoksynotwórcze szczepy *Bacteroides fragilis* (ETBF). Wytwarzana przez nie enterotoksyna wywołuje w hodowlach linii komórkowych charakterystyczne zmiany morfologiczne, podobne do tych, które odpowiadają

za powstanie biegunki. Procedura wykrywania enterotoksyny *Bacteroides fragilis* jest bardzo skomplikowana i niedostępna w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Obecnie prowadzone są prace nad stworzeniem prostych, standardowych testów do wykrywania tej toksyny.

Udowodniono, że w przypadkach dynamicznego rozwoju bakterii siarkowych może dochodzić do zużywania siarki tworzącej mostki w strukturze śluzu jelitowego – mucyny. Wpływ na produkcję nieprawidłowego śluzu jelitowego z jednoznacznym wytwarzaniem toksycznego siarkowodoru czyni z bakterii siarkowych istotny czynnik w etiopatogenezie IBD. Wiadomo jednak, że bakterie redukujące siarczany (*SRB-sulphate-reducing bacteria*) do których należą między innymi: *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfomonas spp*, *Desulfobacter spp*, *Desulfovibrio spp*. *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfobulbus spp*. izoluje się w różnych proporcjach z kału u prawie 98% chorych na UC [116, 118, 206].

Zawarte w produktach spożywczych konserwanty, spulchniacze, sztuczne barwniki, leki czy wysoko przetworzone potrawy zawierające mukopolisacharydy i siarkowe aminokwasy z dodatkiem konserwantów, takich jak dwutlenek siarki, dwusiarczyny i pirosiarczyny stanowiące wyjściowe substraty dla SRB. Również obecna w jelicie mucyna – siarkowy wielocukier, wchodzący w skład śluzu jelitowego – wpływa na wzrost tych bakterii, które mogą redukować znajdujące się w świetle jelita siarczany i w zależności od swego gatunku doprowadzać do powstawania merkaptydów, kwasów merkaptotłuszczowych, siarczków lub wodorosiarczynów. Te ostatnie, podobnie jak i powstający z siarczków siarkowodór, uszkadzają nabłonek jelitowy. Podejrzewa się, że to właśnie siarkowodór bierze udział w patogenezie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [59, 119, 191, 204, 241].

Obecnie istnieją na to jedynie dowody pośrednie, że w kałach chorych stwierdza się znamienne wyższe stężenia siarkowodoru niż u osobników zdrowych. Ponadto wiadomo także, że merkaptyny i siarczki hamują w kolonocytach oksydację kwasów tłuszczowych, głównie n-maślanu, który jest podstawowym substratem energetycznym i wpływa na odporność komórek nabłonka przed działaniem szkodliwych czynników. Dlatego suplementacja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych pod postacią wlewek doodbytniczych pozwala na wzmocnienie właściwości obronnych błony śluzowej, poprawę mikrokrążenia, a tym samym przyspiesza gojenie się owrzodzeń, poprawia metabolizm kolonocytów, co prowadzi do przyspieszenia ich wzrostu i dojrzewania [43].

Osobne zagadnienie stanowi wpływ wspomnianych procesów chemicznych na mucynę, jedną z podstawowych substancji tworzących ochronny śluz. Poza swoją rolę ułatwiającą poślizg resztek pokarmowych, chroni ona kolonocyty przed działaniem szkodliwych czynników zawartych w świetle jelita. Ponadto stanowi jedyne źródło energii dla około 1% prawidłowej flory bakteryjnej. Mucyna poprzez siarkowanie prawdopodobnie zwiększa swo-

ją odporność na degradacyjne działanie bakteryjnych glikozydaz. Dlatego, mimo braku ostatecznych dowodów, uważa się, że obserwowane w stanach zapalnych jelita zaburzenie siarkowania mucyny, spowodowane zużyciem siarczanów przez bakterie SRB, może mieć udział w patogenezie IBD poprzez zwiększenie podatności na degradację bakteryjną i spadek właściwości ochronnych [119, 199].

Uważa się za bardzo prawdopodobne, że zainicjowana przez nieznaną czynnik wzmożona produkcja śluzu, jak to się dzieje w zapaleniu jelita, dostarcza substratów dla bakterii SRB i toksycznego siarkowodoru. Potwierdza to teorię, że bakterie redukujące siarczany nie wywołują wrzodziejącego zapalenia jelita, lecz je jedynie podtrzymują.

Eliminacja tej grupy bakterii z jelita grubego osób chorych, najczęściej poprzez wyłączenie z diety pochodnych siarki, przyspieszała poprawę stanu klinicznego. Takie leczenie dietetyczne jest jednak bardzo trudne, tym bardziej że w IBD stosowana jest dieta wysokobiałkowa, zawierająca znaczne ilości aminokwasów siarkowych. Wydaje się więc raczej wskazane wyeliminowanie mleka, jaj, czy sera zwłaszcza w ostrym okresie choroby [44, 204].

Reasumując: mimo intensywnych badań, w tym metodami najnowocześniejszymi, prowadzonymi na modelach zwierzęcych i u ludzi nie zidentyfikowano żadnego mikroorganizmu wyraźnie związanego z IBD. Możliwe, że taki drobnoustrój nie jest nam jeszcze znany, a tym samym można stwierdzić, że rola bakterii jelitowych w patogenezie choroby pozostaje niejasna.

Końcowe produkty przemian materii pod postacią gazów jelitowych to przede wszystkim: dwutlenek węgla, wodór oraz metan. Wodór i metan nie mogą być metabolizowane przez organizm ludzki, dlatego muszą być w całości wydalone. Badania doświadczalne pozwoliły zaobserwować, że ilość powstającego wodoru zależy od rodzaju spożywanego węglowodanu. Powstający w jelicie wodór może być substratem do dalszych przemian bakteryjnych, takich jak zachodząca w okrężnicy metanogeneza i redukcja siarczanów do siarczków oraz zlokalizowana w końcowym odcinku jelita krętego acetogeneza [116].

### **Rola diety w IBD**

Odrębno omówienia wymaga rola diety w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit. Jak już wspomniano wcześniej zawarte w diecie węglowodany odpowiedzialne są za nasilenie procesów fermentacyjnych. Ponadto produkty odżywcze zawierające aminokwasy siarkowe (mleko, jaja, ser) lub polepszacze żywności (spulchniacze, konserwanty), stymulują rozwój bakterii redukujących siarczany. Związki te mogą modulować odpowiedź immunologiczną zarówno układową jak i na poziomie miejscowym poprzez tworzenie związków antygenowo czynnych z lipopolisacharydami błon komórkowych [193].

Blumberg i Strober stwierdzają, że priorytetem badań nad czynnikami środowiskowymi jest ocena mikrobiologiczna środowiska w obrębie śluzówki jelita i identyfikacja indywidualnych dla danego osobnika patogenów, z drugiej strony analiza przypuszczalnych inicjujących, podtrzymujących, czy zapobiegających temu procesowi elementów. Odpowiedź cytokin na bakterie może być różna: wybrać mogą one drogę negatywną (supresorową) lub pozytywną (efektorową). Autorzy uważają, że w środowisku zurbanizowanym, osoby predysponowane do IBD mogą rozwinąć tę chorobę ze względu na to, że w tym środowisku nie napotkają na antygeny bakteryjne niezbędne do ujawnienia komórek T produkujących czynniki supresorowe. W świetle tych dociekań pozwalają sobie na stwierdzenie, że IBD może nie być schorzeniem, ale raczej zaburzoną adaptacją w efekcie zmienionego środowiska bakteryjnego. Wydaje się, że dalsze badania nad florą jelitową i jak ona aktywuje układ immunologiczny gospodarza, umożliwią zdefiniowanie w pewnej grupie pacjentów, specyficznej substancji mikrobiologicznej, która obecna (bądź jej brak) może inicjować początek choroby [26].

Tak więc, wydaje się, że swoiste i nieswoiste czynniki środowiskowe mogą mieć związek z inicjacją i modulowaniem nieswoistego stanu zapalnego. Przyjmując, że osobnicze predyspozycje genetyczne są stałe, a zachorowalność na IBD stopniowo narasta, wydaje się, że można to wiązać także z rodzajem stosowanej diety.

Reif oraz King dowodzą, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy początkiem IBD, a spożyciem sacharozy zawartej w czekoladzie, coca-coli i gumach do żucia, w większości produktów nabiałowych (mleko krowie i drożdże) a ujemna w odniesieniu do owoców cytrusowych zawierających fruktozę, magnez i witaminę C. Ponadto stwierdzono, że wysoka zawartość w diecie kwasów omega-6 tłuszczowych i/lub niska omega-3 tłuszczowych sprzyja częstszym nawrotom CD, co wiąże się prawdopodobnie z właściwościami immunomodulacyjnymi i przeciwzapalnymi kwasów omega-3 tłuszczowych [124, 201].

Powell i wsp. w swojej pracy podają, że największe działanie inicjujące wystąpienie procesu zapalnego odgrywają obecne w pożywieniu nieczynnne, nieorganiczne mikrocząsteczki. Nie posiadają one wartości odżywczych i stanowią naturalne domieszki produktów odżywczych (gleba, popiół) oraz konserwanty i polepszacze żywności. W świetle jelita te związki łączą się z obecnymi lipopolisacharydami ściany komórkowej bakterii, tworząc substancje antygenowo czynne, mogące modulować miejscową i uogólnioną odpowiedź immunologiczną [196].

Innym istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za wystąpienie i przebieg nieswoistych zapaleń jelit u ludzi dorosłych jest palenie tytoniu. Związki pomiędzy paleniem tytoniu, a występowaniem IBD są szeroko udokumentowane, ale mechanizm tego zjawiska ciągle pozostaje nieznanym. Wiadomo, że palenie tytoniu powoduje między innymi wzrost stężenia krążących

endogennych kortykosteroidów, ma wpływ na liczbę i rodzaj krążących limfocytów (wzrost liczby komórek cytotoksycznych i spadek populacji komórek pomocniczych) oraz wzrost ilości wolnych rodników tlenowych w błonie śluzowej. Powoduje również wzrost przepuszczalności ścian jelit. Palenie tytoniu i jego wpływ na przebieg IBD jest jednym z kryteriów różnicujących UC i CD. Stwierdzono niekorzystny wpływ palenia papierosów na występowanie i przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna, a u niektórych pacjentów z UC palenie tytoniu miało pozytywny wpływ na przebieg kliniczny choroby [24, 45, 116].

Podsumowując, możemy stwierdzić, że predyspozycje genetyczne i liczne czynniki środowiskowe zaburzą homeostazę błony śluzowej jelita, prowadząc do jej pierwotnego uszkodzenia, a w konsekwencji zwiększonej przepuszczalności dla potencjalnych patogenów.

Wzajemne oddziaływanie pomiędzy czynnikami prozapalnymi i protekcyjnymi powinno zapewnić prawidłową homeostazę błony śluzowej jelita. Zaburzenie tej równowagi może być odpowiedzialne za wystąpienie i utrzymywanie się nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Z uwagi na wzajemne zależności przyczynowo-skutkowe pomiędzy predyspozycjami genetycznymi a wpływem czynników środowiskowych, w chwili obecnej trudno jest stwierdzić, który z powyższych czynników posiada decydującą rolę.

Za dominującą rolę predyspozycji genetycznych w etiopatogenezie IBD przemawiają wyniki badań epidemiologicznych oraz fakt, że częstość występowania tych schorzeń jest różna w poszczególnych grupach etnicznych zamieszkujących w tych samych warunkach. Natomiast zwolennicy teorii dotyczącej dominującego udziału czynników środowiskowych w wystąpieniu i utrzymywaniu się nieswoistego zapalenia jelit twierdzą, że w danej populacji predyspozycje genetyczne są zdefiniowane na stałym poziomie.

### **Rola wolnych rodników tlenowych i tlenu azotu w patogenezie IBD**

Do włóknienia i destrukcji struktury jelita przyczyniają się wydzielane poza cytokinami inne mediatory procesu zapalnego jak wolne rodniki tlenowe, tromboksany, leukotrieny, czynniki wzrostowe.

Liczni autorzy podkreślają ostatnio rolę reaktywnych form tlenu (RFT) w patogenezie chorób zapalnych jelita grubego. Wśród tych schorzeń wymienia się nieswoiste zapalenie jelita grubego ze szczególnym uwzględnieniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. W przebiegu choroby obserwuje się zaburzenia ukrwienia śluzówki jelita, któremu towarzyszy uwalnianie RFT. Podnosi się również rolę mechanizmów autoimmunologicznych oraz reakcji nadwrażliwości i uszkodzenie mucyny degradowanej przez RFT. Świadczy o tym obecność nacieków granulocytów wielojądrzastych w obrazie histopatologicznym. Powyższe fakty, jak również cofanie się zmian chorobowych pod wpływem sulfasalazyny i kwasu



5-aminosalicylowego – silnych zmiataczy wolnych rodników, mogą świadczyć o roli RFT w patogenezie UC. W piśmiennictwie sugeruje się, że wywołane przez RFT uszkodzenie mucyny ułatwia wnikanie produktów bakteryjnych do blaszki właściwej i zapoczątkowanie odpowiedzi zapalnej [194, 233].

W doniesieniach ostatnich lat podkreśla się coraz częściej rolę tlenu azotu w schorzeniach przewodu pokarmowego. W komórkach nerwowych jest syntetyzowany z L-argininy przez syntetazę tlenu azotu (NOS), ma właściwości śródbłonkowego czynnika rozkurczowego (EDRF – *endothelium derived relaxation factor*) oraz jest istotnym neuroprzekaźnikiem niecholinergicznego i nieadrenergicznego układu nerwowego (NANC). Uwalniany jest z błony postsynaptycznej i jako wsteczny neuroprzekaźnik działając na błonę presynaptyczną bierze udział w uwalnianiu innego transmittera do przestrzeni synaptycznej między neuronami [50]. Zjawisko to ma znaczenie w regulacji motoryki przewodu pokarmowego, a niedobór tlenu azotu stwierdza się między innymi w chorobie Hirschsprunga, zespole jelita drażliwego, dysfunkcji zwieracza wewnętrznego odbytu, rzekomej niedrożności jelit. Syntetaza tlenu azotu (NOS) w warunkach fizjologicznych jest nieczynna, ale w stanach patologicznych zostaje aktywowana z formy utajonej przez egzo- i endotoksyny, cytokiny TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ . Nadprodukcję NO stwierdza się w *megacolon toxicum*, powikłaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Szkodliwe działanie tlenu azotu wydaje się być związane z powstaniem substancji cytotoksycznych w wyniku reakcji tlenu azotu z wolnymi rodnikami tlenowymi [51, 107].

## 4.2. Jelitowy układ nerwowy (ENS – *enteric nervous system*)

### 4.2.1. Historia

Pierwsze wzmianki o mechanizmach regulacji czynności motoryczno-trawiennej znajdujemy u Hippokratesa, który wprowadził pojęcie „pepsis” i określało ono różne żołądkowo-jelitowe choroby. Vesalius w XVI wieku [2] opisał procesy trawienia i udział w nich różnych narządów przewodu pokarmowego w tym procesie.

Początki rozwoju neurogastroenterologii sięgają około 100 lat wstecz, kiedy to na przełomie XIX i XX wieku w rosyjskiej szkole fizjologii w St. Petersburgu rozpoczęto badania nad mechanizmem wydzielniczym gruczołów przewodu pokarmowego. Wówczas to Pawłow wprowadził pojęcie *nervism*, a dotyczyło ono regulacji nerwowej układu pokarmowego oraz roli nerwu błędnego w tym procesie.

W 1902 r. Bayliss i Starling doświadczalnie udowodnili istnienie ENS oraz odkryli pierwszy neuropeptyd – sekretynę [94, 133]. Auerbach i Meissner udowodnili obecność neuronów w ścianie jelita około 50 lat wcześniej.

Dzięki barwieniu srebrem wprowadzonym przez Cajala odkryto wiele rodzajów neuronów jelitowych. Odkrycie komórki Cajala zrewolucjonizowało wyobrażenie o ich roli w patofizjologii przewodu pokarmowego. Zaowocowało charakterystyką receptorów i kanałów jonowych w tych niezwykłych komórkach. Rolę ich porównywano z komórkami rozrusznikowymi układu bodźcotwórczego w sercu. Ponadto podkreślano ich znaczenie w terapii guzów litych układu pokarmowego [178].

Poznanie neurochemii ENS rozpoczęło od badania nikotyny, której J. Langley używał do mapowania autonomicznego układu nerwowego. W tym samym czasie (1899) duński pediatra Hirschsprung opublikował pierwszy przypadek wrodzonego jelita olbrzymiego. Whitehouse i Kernohan w 1948 r. rozpoznali w tej jednostce agangliozę jelitową, podczas gdy Bodian i wsp. w 1954 r. opisali komponentę genetyczną w niektórych przypadkach choroby Hirschsprunga [195]. W 1906 Edkins, podkreślił hormonalną regulację wydzielania trzustkowo-żołądkowego, a następnie w 1943, Ivy i Olberg odkryli hormon cholecystokininę (CCK). Harper i Raper opisali w 1943 r. inny hormon, pankreozyminę, która pobudza enzymy trzustkowe.

W kolejnych latach pojawiają się prace niemieckich i japońskich badaczy nad innymi hormonami przewodu pokarmowego takimi jak wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), żołądkowy inhibitor peptydowy (GIP), motylina i inne.

W pracach nad rolą hormonów jelitowych ogromny wkład mają także polscy badacze. W 1916 roku Popielski odkrywa zależność wydzielania HCl od sekretyny. Przez ostatnie 30 lat zmieniło się wiele. Pojęcie ENS nie było jeszcze szeroko używane, a udział zwojów nerwowych w perystaltyce jelit – dyskutowany. Były doniesienia o przewodzeniu impulsów z jelita do zwojów przedkręgowych oraz o odkryciu obecności Ach w mięśniówce jelita świnki morskiej [133].

Rozwój neurobiologii, mikrochirurgii, dostępne metody znakowania aksonów pozwoliły na wykazanie kolejnych elementów ENS takich jak neurony, interneurony, motoneurony, poddawano analizie ich udział w motoryce i sekrecji śluzówki. W tym okresie naukowcy zidentyfikowali wszystkie neurony, a skomplikowane symulacje ujawniały wszystkie ich własności. Badania nad receptorami zaczęto prowadzić z wykorzystaniem myszy pozbawionych pewnych genów [178]. Wybitny polski fizjolog Konturek w licznych swoich pracach publikowanych od lat siedemdziesiątych do chwili obecnej, a także wielu badaczy na całym świecie poddaje analizie liczne enterohormony przewodu pokarmowego, neurotransmitery, ich rolę w regulacji motoryki, procesach trawienia i udziału w nich układu nerwowego, licznych neurotransmiterów u ludzi i w doświadczeniach na zwierzętach [94, 98, 102, 134, 179, 216].

W ostatnich kilku latach został poczyniony ogromny postęp w badaniach nad układem nerwowym w przewodzie pokarmowym.

Poszukiwanie najbardziej zbliżonego człowiekowi modelu zwierzęcego, analiza działań i zależności zachodząca w tym skomplikowanym w swoim działaniu systemie kontroli licznych funkcji organizmu daje nadzieję na wykorzystanie tych doświadczeń do lepszych możliwościach diagnostycznych i terapeutycznych u ludzi. Podstawowa organizacja i funkcjonowanie ENS są mniej więcej takie same u wszystkich gatunków [41, 51, 102, 159, 160, 161, 163, 168, 183].

#### 4.2.2. Organizacja i klasyfikacja ENS

ENS rozwija się z komórek prekursorowych grzebienia nerwowego neuroektodermy, migrujących do jelita. Ontogeneza jelita zaczyna się w 8 tygodniu od żołądka i ukończona zostaje około 13 tygodnia życia płodowego. Łączność między nerwami jelitowymi a efektorami rozwija się około 26 tygodnia, a pierwsze oznaki motoryki wykryto u płodu w 25 tygodniu. 5-HT łącznie z glukagonem, insuliną, peptydem YY, gastryną i somatostatyną pojawiają się między 8 a 24 tygodniem. Większość neurohormonów gastrojelitowych jest zidentyfikowana. Nowe komórki nerwowe nadal się różnicują przez pierwsze lata życia, co oznacza, że układ nerwowy niemowlęcia jest plastyczny i rozwija się w tym okresie [76, 94].

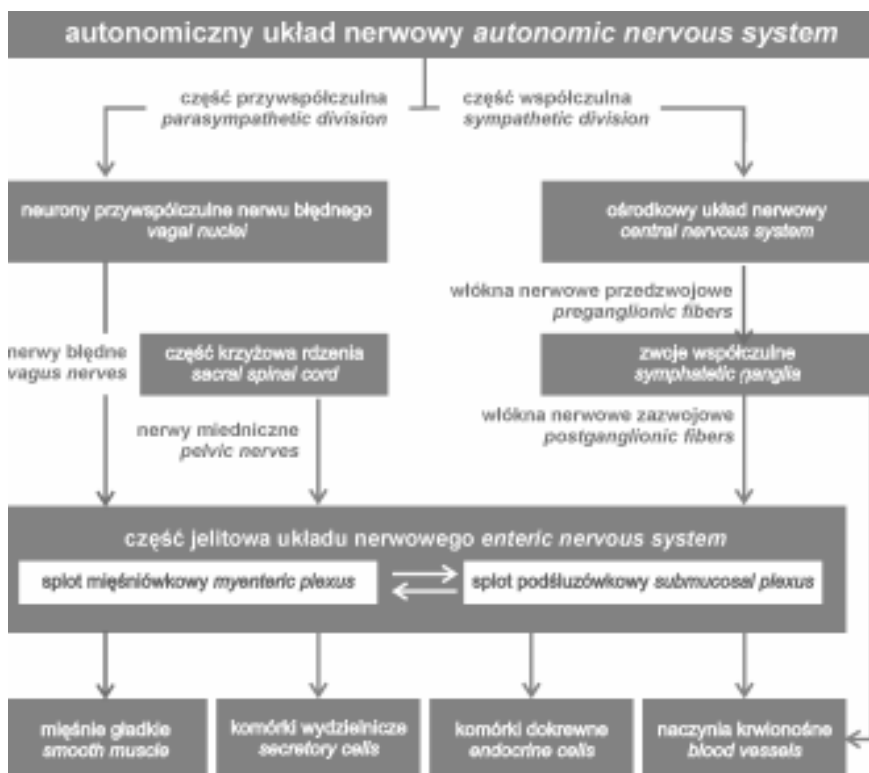
Jelitowy układ nerwowy bierze udział w większości fizjologicznych i patofizjologicznych procesów w przewodzie pokarmowym. ENS reguluje czynności żołądka i jelit, włączając perystaltykę, wydzielanie, przepływ krwi i układ immunologiczny [49, 94, 97].

W ciągu ostatnich 10 lat dokonał się ogromny postęp w rozumieniu farmakologicznych podstaw funkcjonowania jelitowego układu nerwowego i jego zasadniczej roli w funkcjonowaniu jelit w kilku stanach chorobowych. W zasadzie wiedza dotycząca ENS staje się inspiracją dla leczenia wielu objawów i zaburzeń żołądkowo-jelitowych. Niektóre nowe koncepcje terapeutyczne są już w użyciu klinicznym, np. toksyna botulinowa w achalazji czy leki serotonergiczne w funkcjonalnych chorobach jelita [96, 240, 256].

ENS ma ogromne znaczenie dla czynności takich jak: przyjmowanie pokarmu, działanie pęcherzyka żółciowego i trzustki, a tym samym pełni rolę w takich zaburzeniach, jak zaburzenia perystaltyki prowadzące do biegunek lub zaparć, niedokrwienie jelit nie mające związku ze zwężeniem światła naczyń, stany zapalne jelit, kamica żółciowa, zapalenie pęcherzyka żółciowego, zespół cholelitystektomijny i zapalenie trzustki [17, 240].

Jelitowy układ nerwowy (ENS – *enteric nervous system*) jest obok części współczulnej (sympatycznej), przywspółczulnej (parasympatycznej) i czuciowej (afferentnej) składową autonomicznego układu nerwowego.

Nerwy ruchowe i czuciowe z włóknami współczulnymi i przywspółczulnymi dochodzą do jelita z nerwu błędnego. Włókna przywspółczulne unerwiają prawą połowę okrężnicy, natomiast lewa jej połowa i odbytnica unerwiona jest przez nerwy trzewne miedniczne.



**Ryc. 1. Ogólny schemat unerwienia autonomicznego (Costa M, Furness JB. Br. Med. Bull 38; 247, 1982)**

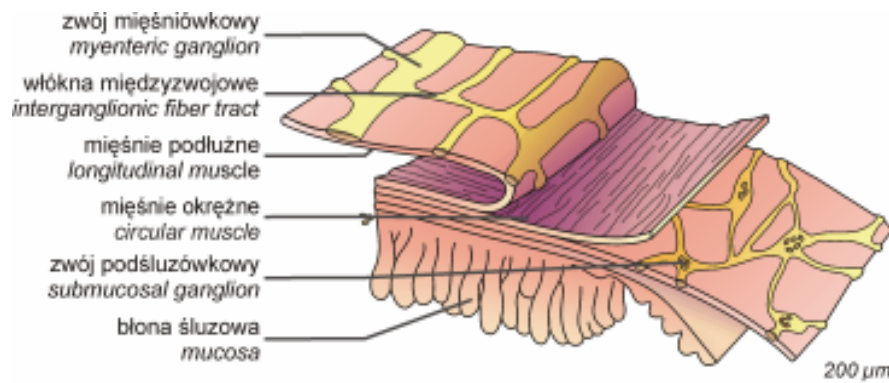
**Fig. 1. General plan of the autonomic innervation (Costa M, Furness JB. Br. Med. Bull 38; 247, 1982)**

Jelitowy układ nerwowy (ENS) jest to układ neuronów, które działają mniej lub bardziej niezależnie od OUN. ENS funkcjonuje autonomicznie, ale prawidłowe funkcjonowanie wymaga komunikacji z OUN. Połączenia te przybierają postać włókien przywspółczulnych i współczulnych, łącząc układ nerwowy ośrodkowy z jelitowym. Dzięki tym krzyżowym zależnościom, informacje czuciowe z jelita mogą biec do OUN, a OUN może mieć wpływ na funkcje przewodu pokarmowego. Informacji z jelit do mózgu płynie więcej w stosunku jelito:mózg jak 9:1. Połączenie z OUN oznacza także, że sygnały spoza przewodu pokarmowego mogą być doń przekazywane, np. widok jedzenia pobudza wydzielanie żołądkowe. Generalnie stymulacja współczulna hamuje sekrecję, motorykę i kurczliwość zwieraczy oraz naczyń krwionośnych w przewodzie pokarmowym; przywspółczulna działa przeciwnie. Wewnętrzne połączenia neuronalne zapewniają natomiast istnienie reakcji odruchowych np. odruch żołądkowo-okrężniczy, gdzie rozciągnięcie ściany żo-

ładka pobudza opróżnienie okrężnicy, albo rozciągnięcie jelita cienkiego hamuje wydzielniczą i motoryczną aktywność żołądka [76, 95].

ENS ma lokalną kontrolę nad ruchami mieszającymi oraz propulsywnymi w jelicie. W trakcie trawienia IPANs (pierwotne wewnętrzne aferentne neurony) są aktywowane przez zawartość jelita. Neurony tego typu znajdują się w zwojach mięśniowych jelita. Odbierają one bodźce chemiczne lub mechaniczne. Bezpośrednio łączą się z neuronami mięśni gładkich oraz interneuronami (wstępującymi i zstępującymi) Komórki mięśniowe tworzą rodzaj syncytium unerwionego przez około 300 pobudzających i 400 hamujących neuronów motorycznych na 1 mm długości [141, 250].

Rozmiar i złożoność ENS jest ogromna i zawiera tak wiele nerwów jak rdzeń kręgowy. Ludzki ENS składa się ze zwojów mięśniówki (zwoje Auerbacha) oraz zwojów podśluzówkowych. Te drugie dzielą się na 3 oddzielne grupy zwojów: wewnętrzne podśluzówkowe (Meissnera), bezpośrednio pod muscuclaris mucosa, zwoje podśluzówkowe zewnętrzne (Schabadascha lub Henle) przylegające bezpośrednio do warstwy okrężnej mięśni oraz pośrednich zwojów, zlokalizowanych między pozostałymi dwoma grupami.



**Ryc. 2. Schemat jelitowego układu nerwowego (ENS) na przekroju całej ściany jelita grubego (Wood JD. In Johnson RL., ed.: Physiology of gastrointestinal tract, 2, New York, 1987)**

**Fig. 2. General plan of enteric nervous system (ENS) on colon cross section (Wood JD. In Johnson RL., ed.: Physiology of gastrointestinal tract, 2, New York, 1987)**

Taka topografia ma swoje odzwierciedlenie w funkcji – zwoje mięśniówki w aktywności mięśniowej, a podśluzówkowe – w funkcji wydzielniczej błony śluzowej. Miejscami zwojów jest mało, na przykład w przełyku, gdzie ich funkcja jest minimalna [10, 70, 76, 95, 221, 244]. Ludzki ENS zawiera około 100 mln neuronów i obejmuje wiele różnych typów komórek nerwowych, które są rozmieszczone specyficznym dla odcinka przewodu pokarmowego, jak i zadań które mają spełniać. Gęstość neuronów jest duża w splocie mięśniówkowym, mniejsza w splocie podśluzów-

kowym [257]. Średni stosunek neuronów czuciowych, pośrednich i ruchowych wynosi 2:1:1. Poszczególne odruchy przekazywane są przez różną liczbę neuronów [50,141]. Każdy neuron generuje impuls elektryczny w odpowiedzi na chemiczne lub mechaniczne stymulowanie, przewodzi przez wypustki i na zakończeniu przekształca go w sygnał chemiczny [16, 50, 63, 76].

#### 4.2.2.1. Neurony ENS

Neurony ENS można sklasyfikować na podstawie cech morfologicznych, neurochemicznych albo funkcji. Cechy te zostały określone przy pomocy różnych metod m.in.: mikroskopii świetlnej i elektronowej, immunohistochemicznie, przy pomocy analizy elektrofizjologicznej, barwienia śródkomórkowego oraz wstecznego śledzenia projekcji neuronalnej [95].

Sieci neuronalne kontrolujące funkcje trawienne są ulokowane w obrębie OUN, rdzeniu kręgowym, splotach współczulnych przedkręgowych oraz w ścianach narządów tworzących układ pokarmowy, a więc od przełyku po odbył oraz gruczołów takich jak ślinianki, trzustka i pęcherzyk żółciowy. Należy podkreślić, że nie tylko motoryczne i wydzielnicze, ale także pozostałe komórki jelita podlegają działaniu neuronów jelitowych na przykład: endokrynne, jelitowe Cajala, układu odpornościowego, zwojów nerwowych a także naczyń krwionośnych. Wzajemne oddziaływanie między neuronami jelita, a komórkami odpornościowymi zdaje się mieć kardynalne znaczenie w procesach chorobowych zachodzących w jelicie [63, 16].

Stwierdza się trzy rodzaje neuronów, podzielonych ze względu na funkcje – większość z nich jest wielobiegunowa:

- a. Neurony czuciowe zawierają mechano- chemo- i termoreceptory, które otrzymują informacje z receptorów w śluzówce i mięśniówce i odbierają bodźce chemiczne, termiczne, osmotyczne i mechaniczne. Mechanoreceptory są aktywowane przez rozdęcie i powodują toniczny skurcz mięśni, a wówczas jeśli rozdęcie jest podtrzymywane, powodują one aktywność perystaltyczną. Istotnym zagadnieniem w patologii przewodu pokarmowego jest ból. Mechanoreceptory o wysokim progu pobudliwości w warunkach zwyczajnych pozostają uśpione i ciche, ale ulegają pobudzeniu w czasie sytuacji takich jak uraz albo zapalenie. Uśpione mechanoreceptory ulegają pobudzeniu przez drugorzędowe neurony (interneurony i motoneurony). Chemoreceptory wrażliwe na kwas, glukozę i aminokwasy pozwalają rozpoznać treść jelita. Receptory mięśniówki odpowiadają na rozciąganie i skurcze. Receptory czuciowe odbierają informacje o zawartości jelita i stanie jego ściany [46, 70, 71, 95, 105, 127, 141].
- b. Interneurony, odpowiedzialne są za integrację informacji z neuronów czuciowych i przekazywanie ich do motoneuronów w których zachodzi proces programowania. Interneurony, z których mniejsza część to neurony wstępujące, głównie cholinergiczne, pozostałe w większości zstępujące mają złożone kodowanie chemiczne, zawierają acetylocholi-

nę, tlenek azotu, VIP, 5-HT i somatostatynę i są zaangażowane w lokalne odruchy motoryczne [50, 70].

- c. Motoneurony kontrolują motorykę i sekrecję, możliwe że także absorpcję. Oddziałują bezpośrednio na liczne komórki efektorowe, w tym mięśnie gładkie, komórki wydzielnicze i endokrynne oraz przepływ krwi w przewodzie pokarmowym poprzez uwalnianie ACh i VIP [98, 257].

Wyróżnia się 3 typy motoneuronów – neurony motoryczne mięśni, sekretomotoryczne oraz neurony unerwiające komórki enteroendokrynne. Motoneurony mięśniowe unerwiają mięśnie podłużne i okrężne oraz mięśniówkę błony śluzowej przewodu pokarmowego, a także uwalniają transmittory wywołujące skurcz lub rozkurcz mięśni. Motoneurony mięśniówki błony śluzowej także mają własności pobudzające i hamujące, ale rola ich nie jest ostatecznie wyjaśniona [70]. Jako inhibitory, motoneurony są stale aktywne i to stan ich aktywności decyduje kiedy dojdzie do skurczu. Utrata lub dysfunkcja motoneuronów hamujących leży u podłoża kilku postaci przewlekłych, idiopatycznych zaparć i achalazji przełyku, diagnozowanych za pomocą manometrii. Większość neuronów sekretomotorycznych ma swoje ciała komórkowe w zwojach śluzówkowych tworząc sieć poniżej nabłonka śluzówki. Niektóre neurony mają projekcje do zwojów mięśniowych, inne zaś zaopatrują mięśniową i podśluzówkową warstwę śluzówki, penetrują zwłaszcza do krypt i stymulują w nich sekrecję [105]. Wyróżniamy 2 główne typy neuronów sekretomotorycznych – cholinergiczne i niecholinergiczne. Neurony nie-cholinergiczne pośredniczą w większości miejscowych odruchów angażując VIP jako transmittora [70]. Neurony części enterycznej skupione w splotach Meissnera i Auerbacha zawierają krótkie neurony aferentne, interneurony, neurony eferentne, które zaopatrują mięśnie gładkie, gruczoły oraz naczynia krwionośne przewodu pokarmowego.

W wyniku działania bodźców mechanicznych, chemicznych związanych z przesuwaniem się treści pokarmowej oraz powstającymi w tym procesie produktami trawienia, a także działaniem samych soków trawiennych, informacje o procesach dotyczących energii, homeostazy płynów oraz czucia dyskomfortu i bólu, dochodzi do pobudzenia neuronów aferentnych o wysokim progu pobudliwości. Informacje te przekazywane są do mózgu [70, 127].

W wyniku tego procesu impulsy docierają do interneuronów poprzez neurotransmitery uwalniane na zakończeniach nerwowych splotów.

Neurony zazwyczaj wydzielają kombinację różnych neurotransmiterów i zjawisko to jest zwane kodowaniem chemicznym. Kod chemiczny zależy od typu neuronu, gatunku i odcinka jelita.

#### 4.2.2.2. Neurotransmitery protekcyjne ENS

Neurotransmiterami, zwanymi również neuroprzekaźnikami określa się te substancje, które uwalniane są z komórek nerwowych (zarówno przed-, jak i zazwojowych) pod wpływem impulsu nerwowego. Wypustki tych komórek tworzą połączenia synaptyczne z innymi neuronami, albo na innych komórkach efektorowych (mięśniowych i/lub gruczołowych) przewodu pokarmowego, powodując ich pobudzenie lub hamowanie. Transmittery, uwalniane do szczeliny synaptycznej wiążą się z receptorami na błonach postsynaptycznych, generując nowy impuls. Neurotransmitery mogą być także uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (w przypadku synaps en passage), gdzie mogą posiadać funkcje parakrynną, jeżeli działają lokalnie, wiążąc się z receptorami znajdującymi się na innych neuronach lub komórkach immunologicznych, znajdujących się w sąsiedztwie [16, 63, 154, 172].

Badania przeprowadzone w ostatnich kilku latach dostarczyły niepodważalnych dowodów co do udziału neuropeptydów (substancji transmisyjnych komórek nerwowych) w powstawaniu, rozwoju i zejściu szeregu procesów patologicznych.

##### **Podział neurotransmiterów:**

Neurotransmitery klasyczne, drobnocząsteczkowe, do których zalicza się acetylocholinę (ACh), aminy katecholowe (noradrenalina, dopamina, serotonina) oraz niektóre aminokwasy. Ich uwalnianie i działanie następuje bardzo szybko po zadziałaniu impulsu i trwa ułamki sekund.

Następna grupa to znacznie później poznane neuropeptydy, substancje wielkocząsteczkowe, których działanie jest wolniejsze, ale efekt ich działania trwa dłużej niż neurotransmiterów drobnocząsteczkowych. Niektóre z tego rodzaju neurotransmiterów określa się także jako neuromodulatory i chociaż nie posiadają działania transmisyjnego per se, są w stanie modulować odpowiedź komórki docelowej na działanie innych substancji transmisyjnych, np. transmitterów klasycznych. Białko klasyfikowane jako neuropeptyd, musi być syntetyzowane w neuronie i działać poprzez wiązanie się z receptorami błonowymi i/lub cytozolowymi na komórki docelowe. Neuropeptydy są największą grupą poznanych dotąd transmitterów. U kręgowców neuropeptydy obecne są we wszystkich częściach układu nerwowego, w tym w neuronach przed- i zazwojowych układu autonomicznego, a także w neuronach OUN [154].

Do grupy neuropeptydów należą neuropeptydy opioidowe takie jak enkefaliny, dynorfiny i endorfiny. Enkefaliny, obecne w części neuronów peptyderygicznych splotów przewodu pokarmowego, działają na tkanki docelowe poprzez aktywację receptorów opioidowych ( $\delta$ ,  $\kappa$  oraz  $\mu$ )

Drugą grupę neuropeptydów stanowią neuropeptydy nieopiodowe, a zalicza się do niej neurotransmitery związane z układem czuciowym: sub-



stancja P (SP), cholecystokinina (CCK), peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP) oraz galanina (GAL), kotransmitery układu współczulnego: neuropeptyd Y (NPY), somatostatyna (SOM) oraz kotransmitery układu przywspółczulnego, jak wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP). Zlokalizowane w komórkach wydzielniczych i w obrębie neuronów układu autonomicznego odgrywają rolę w wielu procesach fizjologicznych przewodu pokarmowego [135, 172].

Ostatnią dotychczas poznaną, trzecią grupę neuroprzebieżników stanowią substancje gazowe. Od kilku lat wiadomym jest, że uwalniany z zakończeń nerwowych tlenek azotu (NO), syntetyzowany *in situ* przez enzym syntetazę tlenku azotu (NOS) pełni rolę neurotransmitera zarówno na terenie OUN, jak i układu autonomicznego [137].

Określenie działań neurotransmiterów jest trudne z tego powodu, że w większości pęczków nerwowych znajdują się włókna należące do różnych, wymienionych wcześniej układów i są one przemieszane. Co więcej, w tym samym neuronie mogą być wytwarzane również dwa lub więcej różnych neuroprzebieżników. Wiedza dotycząca obecności i roli neurotransmiterów w przewodzie pokarmowym jest różna, stanowiąc temat zainteresowań naukowych neurofizjologów, neurobiologów, gastrologów, neurologów, psychiatrów, a badania te nierozdzielnie wiążą się z doświadczeniami na zwierzętach [27, 30, 51, 67, 89, 147, 253, 256, 261].

Dotyczy to nie tylko badania działania poszczególnych substancji, ale również ich prób zastosowania w terapii różnych schorzeń przewodu pokarmowego, w tym nawet chorób nowotworowych [65, 66, 97, 160, 252].

Najnowsze badania wskazują na dodatkową rolę neurotransmiterów, a mianowicie ich wpływ na regulację czynności układu immunologicznego oraz funkcję regulacyjną w kontroli migracji leukocytów, wzroście guzów, ich inwazji do okolicznych tkanek i tworzeniu przerzutów. Frank Entschladen akcentuje w swoim artykule złożoną, interaktywną rolę transmiterów w tych procesach [66].

W ostatnich latach w piśmiennictwie spotyka się wiele prac analizujących rolę, jaką pełnią neurotransmitery w kontroli funkcji jelita w stanie zdrowia i choroby. Większość tych doniesień dotyczy eksperymentów na zwierzętach, a uzyskane wyniki pozwalają silnie akcentować rolę transmiterów o właściwościach neuroprotekcyjnych. Ta ich cecha ma istotne znaczenie w ograniczeniu tempa procesów destrukcji, a także neurodegradacji, jakie mają miejsce w przewlekłych, zapalnych chorobach jelit. Z uzyskanych dotychczas danych jasno wynika, że najważniejszą rolę zdają się pełnić VIP, PACAP (należących do nadrodziny sekretyny) i najmniej poznany do chwili obecnej neuroprotekcyjny transmiter jakim jest GAL, której receptory (GAL-R) należą do rodziny receptorów białkowych GPCR [30, 89, 160].

Badania dotyczące roli jelitowego układu nerwowego (ENS) u ludzi napotykać na zrozumiałe trudności z pozyskaniem materiału badawczego i z tego powodu istnieje niewiele publikacji na ten temat [40, 54, 65, 113, 115, 165].

### **Galanina (GAL)**

Galanina jest białkiem aktywnym biologicznie, składającym się u ludzi z 30 aminokwasów. Wyizolowana została po raz pierwszy w 1983 r w laboratorium Dr Mutt'a [28, 243].

Ewolucyjnie galanina jest bardzo starym białkiem, występującym w omalże niezmięnionej formie zarówno u bezkręgowców, jak i niższych i wyższych zwierząt kręgowych. W przypadku człowieka, naukowcy z Uniwersytetu w Londynie wykazali obecność galaniny w nerwach zachowanych mumii egipskich z przed 3500 lat. [Mummies reveal medical secrets. January 7, 1998, <http://news.thdo.bbc.co.uk/hi/english/sci/tech/newsid>].

Galanina jest szeroko rozpowszechniona zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym, a także w układzie endokrynnym. GAL znajduje się w specyficznych jądrach nerwowych w obrębie mózgu i rdzenia, jak i w zwojach obwodowego układu nerwowego [108, 264]. Galanina ma istotne znaczenie w takich schorzeniach jak akromegalia, biegunka, zapalenie jelit, choroba Alzheimer'a, w gruczolakach przysadki u człowieka i zwierząt [52, 265].

Obecność licznych struktur nerwowych zawierających GAL w podwzgórzu sugeruje, że peptyd ten jest najprawdopodobniej modulatorem czynności osi podwzgórzowo-przysadkowej. Badania fizjologiczne u zwierząt i ludzi umożliwiły identyfikację szerokiego spektrum jej oddziaływań biologicznych. GAL wywiera silny efekt neuroendokrynnny poprzez modulowanie uwalniania gonadotropin, prolaktyny, hormonu wzrostu i somatostatyny, a także, działając na wewnątrzwydzielniczą część trzustki, na uwalnianie insuliny [265]. W obrębie OUN GAL moduluje uwalnianie kilku neurotransmiterów, wpływa między innymi na aktywność ośrodka łaknienia i pragnienia, a także kontroluje pobudliwość i regenerację nerwów. Jest ona również powiązana z patologiczną aktywnością nerwową w przebiegu padaczki, wpływa również w znacznym stopniu na motorykę i sekrecję przewodu pokarmowego. Anatomiczne i neurochemiczne dane potwierdzają istotną rolę galaniny w procesach poznawczych, takich jak uczenie się, zapamiętywanie oraz w procesach afektywnych jakimi są depresja i niepokój [17, 163, 166, 181]. Rozpowszechnienie wielorakości funkcji galaniny sprawia, że galanina jest ważnym przekaźnikiem w komunikacji komórkowej.

GAL jest otrzymywana w toku przemian z dużego białka prekursorowego znanego jako preprogalanina. Przez wiele lat uważano, że GAL nie wykazuje żadnego podobieństwa do jakiegokolwiek innego znanego białka przekaźnikowego. Ostatnio wyizolowano nowy, podobny do galaniny peptyd (GALP) z podwzgórza świni, a GALP cDNA był następnie wyizolowany

z mózgowia świni, szczura i człowieka. Jak wykazano, część sekwencji aminokwasów GALP (9-21) jest identyczna z końcowym odcinkiem łańcucha aminokwasowego galaniny [17, 144, 208, 252].

Charakterystyczną cechą ekspresji genu galaniny jest jej znamienne pobudzenie przez estrogeny. Receptory galaninowe (GAL-R) należą do grupy podwójnych receptorów białka G (GPCR). Natywne receptory galaninowe wywierają wpływ na fizjologię komórki, tj. na hamowanie aktywności cykazy adenylowej i produkcję cAMP. do dzisiaj sklonowano od ludzi i gryzoni trzy różne podtypy GAL-R (GAL-R1, GAL-R2 oraz GAL-R3), przy czym okazało się, że sekwencja każdego podtypu receptora wykazuje znaczną homologię pomiędzy gatunkami (GAL-R1 szczura posiada aż 92% podobieństwa do ludzkiego GAL-R1 człowieka i 94% podobieństwa do Receptora stwierdzanego u myszy) [223, 231]. Każdy z trzech podtypów jest kodowany przez oddzielne geny, zlokalizowane u człowieka na różnych chromosomach. Locus GAL-R3 znajduje się u człowieka na chromosomie 22q13.1 [28, 163, 231].

GAL jest obecna w nerwach zaopatrujących przewód pokarmowy (GI), które w warunkach prawidłowych zaangażowane są w regulację motoryki jelit poprzez oddziaływanie ich transmitera na GAL-R1, zlokalizowanego w błonie komórek mięśni gładkich. Komórki nabłonka jelita grubego normalnie nie wykazują ekspresji tego typu receptora, białko to zostaje jednak syntetyzowane pod wpływem czynnika transkrypcji NFκB. Wcześniej wykazano, że zapalenie ściany jelita, powodowane podawaniem siarczanu dekstranu sodu (DSS – *dextran sodium sulfate*), wiąże się z nasileniem ekspresji GAL-R1, co objawia się zwiększoną sekrecją Cl – w nabłonku okrężnicy; nie udało się jednak określić wpływu GAL na ten proces. Dlatego stworzono model myszy, tak zwany gen knock-out, niezdolnej do syntezy GAL-R1 (myszy GAL-R1<sup>-/-</sup>). Zarówno u szczepów dzikich, jak i u myszy GAL-R1<sup>-/-</sup> wykazano identyczne histologicznie uszkodzenia pod wpływem DSS. Stwierdzono charakterystyczne nacieki zapalne, aktywację NFκB w enterocytach i nerwach jelita oraz trzykrotny wzrost zawartości GAL w nerwach. Przesiękanie płynu do światła jelita było o połowę mniejsze u myszy GAL-R1<sup>-/-</sup> w porównaniu do przedstawicieli szczepów dzikich, co sugeruje, że wzrost sekrecji płynu do światła jelita zależny jest mniej więcej w połowie od ekspresji GAL-R1, indukowanej działaniem DSS [161, 252]. Jedną z charakterystycznych cech procesu gojenia się uszkodzonych nerwów obwodowych jest znaczny wzrost ekspresji i syntezy GAL przez dotkniętą urazem komórkę nerwową. Po aksotomii (przecięcie wypustek obwodowych komórek nerwowych), poziom zarówno mRNA kodującego GAL, jak i samego białka zwiększa się w neuronach czuciowych i autonomicznych. Poziomy te pozostają niezwykle wysokie podczas procesu regeneracji uszkodzonych wypustek. Podobnie do aksotomii, także stan zapalny, jak również prze-

wlekłe uszkodzenie nerwów, powoduje znaczny wzrost poziomu galaniny w neuronach dotkniętych schorzeniem. Stwierdzono także, iż mechaniczne uszkodzenia w różnych okolicach mózgu, podobnie jak ma to miejsce na obwodzie, wywołuje znaczne zwiększenie ekspresji galaniny w neuronach OUN. Spekuluje się, że prawdopodobnie GAL odgrywa znaczącą rolę jako czynnik troficzny, wpływając nie tylko na proces *restitutio ad integrum* wypustki nerwowej, lecz także na funkcjonalną reaktywację nerwów po ich uszkodzeniu [252].

Coraz szersze poznanie właściwości GAL i jej roli w regulacji czynności wielu układów i narządów, uzyskane dzięki eksperymentom na modelach zwierzęcych, staje się podstawą do pierwszych ocen roli tego neurotransmitera w wybranych schorzeniach przewodu pokarmowego [115, 258, 264]. Aczkolwiek u człowieka do chwili obecnej przeprowadzono oznaczania poziomu wielu neuropeptydów w tkankach przewodu pokarmowego, GAL do chwili obecnej badano w przewodzie pokarmowym w stanach zdrowia i choroby jedynie w niewielu pracach [82, 262].

Postuluje się, że przemiany proteolityczne GAL są różne, w zależności od tkanki, jak i regulacji syntezy GAL w tej tkance. Obecność specyficznych fragmentów tego peptydu, stanowiących selektywne ligandy dla poszczególnych podtypów receptorów, może być podstawą do wyjaśnienia różnorodności funkcji GAL w organizmie. Ich identyfikacja mogłaby ułatwić zrozumienie potencjalnych terapeutycznych właściwości agonistów i/lub antagonistów receptorów galaninowych [89, 252].

### **Wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP)**

VIP należy, łącznie z sekretyną, czynnikiem uwalniającym hormon wzrostu oraz PACAP do dużej nadrodziny powiązanych strukturalnie peptydów.

VIP jest wielofunkcyjnym transmittersem ENS, peptydem złożonym z 28 aminokwasów, zdolnym do wywoływania sekrecji gruczołów GI oraz rozkurczu naczyniowych i nie-naczyniowych mięśni gładkich [96]. Co więcej, peptyd ten odgrywa istotną rolę w procesie neuroprotekcji, a także w reakcjach anty-zapalnych. Neuroprotekcyjne działanie VIP odbywa się głównie poprzez stymulację astrocytów. Jest on produkowany przez wiele komórek i na wielu ma swoje receptory [21, 234, 262, 266]. Na terenie jelita stwierdzono, że niektóre neurony VIP-ergiczne zwojów podśluzówkowych wysyłają swoje aksony do zwojów mięśniówkowych, co może stanowić funkcjonalną podstawę związku pomiędzy wydzielaniem, a motoryką. Sekretomotoryczne neurony VIP-immunoreaktywne otrzymują hamujące impulsy z zewnątrzpochodnych neuronów współczulnych, oraz z niezidentyfikowanych do tej pory neuronów zwojów mięśniówkowych [50].

Do chwili obecnej udało się sklonować 3 typy receptorów dla VIP i/lub PACAP. Pierwszy z nich to PAC1, cechujący się dużym powinowactwem dla PACAP, ale niskim dla VIP. Kolejne poznane podtypy recepto-

rów to VPAC1 i VPAC2, które charakteryzują się w przybliżeniu takim samym powinowactwem do VIP i PACAP. Co więcej, na terenie jelita wykazano obecność receptorów VIP/PACAP o charakterze VIP specyficznych (tzn. aktywowanych przez VIP, ale nie przez PACAP), oraz receptory preferujące PACAP. Analogicznie do VIP, w zwojach śródściennych jelit wykazano ekspresję PACAP, której intensywność podlega znacznym zmianom pod wpływem stanów patologicznych, takich jak blokada transportu aksonalnego (odpowiednik, np. zmiążdżenia nerwu), aksonotomia (jatrogenne uszkodzenie w trakcie zabiegów chirurgicznych) lub w przebiegu hipertrofii tkanek jelita. W odróżnieniu od VIP, PACAP nie wydaje się jednak być zaangażowany we wspieranie przeżywalności uszkodzonych komórek zwojów mięśniówkowych. VIP silnie oddziałuje modulując na czynność układu immunologicznego jelita. Zmniejszone stężenie VIP-IR i neuronów VIP w obrębie przewodu pokarmowego opisano w badaniach Kocha i Kubota [131, 140].

VIP wywiera wysoce korzystny efekt w znoszeniu zapalenia jelit, które było indukowane podawaniem dojelitowym roztworu TNBS (eksperymentalny model CD u myszy). Podany dootrzewnowo zwierzętom z wywołanym przez TNBS colitis, VIP zmniejszał kliniczne i histologiczne objawy zapalenia. Jak wykazano, powodem takiego działania było hamowanie ekspresji cytokin prozapalnych ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-12}$ ), oraz wzmożeniu syntezy i uwalniania cytokin przeciw-zapalnych (szczególnie  $\text{IL-10}$ ), co wykazano mierząc stężenia tych substancji zarówno w ekstraktach zapalnie zmienionej ściany okrężnicy, jak i w surowicy. Dodatkowo trzeba podkreślić, że zapalenie jelita wywołuje sekrecję cytokin, takich jak  $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  czy  $\text{TGF}\beta$  przez komórki zwojów krezkowych. Większość badań prowadzona jest jednak na modelach zwierzęcych, ostatnio coraz częściej u świń (jako najlepszego modelu zwierzęcego dla narządów człowieka). W trakcie wywołanego podaniem TNBS zapalenia jelita grubego wykazano jednakże, że mimo wpływu na migrację komórek jednojądrzastych, VIP prawdopodobnie nie hamuje rozwoju tego typu colitis, a tym samym prawdopodobnie nie stanowi potencjalnego leku w terapii IBD [175].

W chwili obecnej brak jest danych, pozwalających nie tylko na zrozumienie mechanizmów, dzięki którym możliwe jest tak różnorodne działanie biologiczne VIP, ale także na powiązanie jego oddziaływań z działaniem innych transmiterów neuroprotekcyjnych, jak na przykład GAL [1, 8, 63, 175, 221]. VIP odgrywa istotną rolę w neuroprotekcji zarówno w ośrodkowym jak i jelitowym układzie nerwowym [137]. W OUN, neurotroficzne działanie VIP zdaje się przebiegać za pośrednictwem, między innymi, wielu cytokin ( $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-3}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) [197]. Co więcej, VIP powoduje syntezę i uwalnianie NO z neuronów kory mózgowej oraz komórek zwojów autonomicznych u szczurów. Wyniki badań, w których podawano po wywołanym urazie OUN, a także w przebiegu chorób neu-

rodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona i stwardnienie rozsiane, terapeutyczne dawki VIP lub PACAP sugerują, że peptydy te wydają się chronić uszkodzone komórki przed śmiercią. Sugestie te wynikają z doniesień, że VIP i PACAP hamują poprzez mikroglej produkcję mediatorów zapalnych [63].

Busto wskazała również rolę tych neurotransmiterów w stanach fizjologii i patologii płuc, m. in. w chorobie nowotworowej, gdzie w zmiennej chorobowo tkance płuc stwierdzono obecność receptorów dla VIP i PACAP, a aktywność cyklicznej adenylowej (AC), stymulowanej przez te neuropeptydy, była znacznie mniejsza niż w płucu zajęтым procesem nowotworowym [37]. Wykazano również rolę VIP w stymulacji odpowiedzi immunologicznej w chorobie nowotworowej gruczołu krokowego, a także u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, w czasie wstrząsu septycznego, gdzie VIP moduluje specyficzne reakcje tkankowe na mediatory uwalniane z mastocytów [1, 74, 109, 248].

Wykazano obecność autoprzeciwciał wiążących VIP u myszy podatnych na choroby z autoagresji, były one obecne również u ludzi z chorobami autoimmunologicznymi. Częste występowanie autoprzeciwciał skierowanych przeciwko VIP sugeruje, że immunologiczna tolerancja dla tego neuropeptydu może zostać złamana. Zmniejszenie poziomu VIP w chorobach z kręgu autoimmunologicznych może wiązać się z regulacją komórek T i w efekcie nasilać odpowiedź autoreaktywną [12].

VIP tradycyjnie był klasyfikowany jako neuropeptyd/neurotransmitter w oparciu o jego zdolność do regulowania funkcji neuronalnych. Najnowsze prace wykazały, że VIP jest także produkowany przez limfocyty T, głównie Th2, i że oddziałując na specyficzne receptory odgrywa rolę w układzie nerwowym i immunologicznym przypisywaną dotychczas cytokinom produkowanym przez limfocyty Th2. W konkluzji swej pracy Newman sugeruje, że VIP powinien być traktowany jako cytokina, pełniąca kluczową rolę w neuroimmunologii [175, 193, 197].

### **Peptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylową (PACAP)**

Peptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylową (PACAP) jest peptydem o silnie zaznaczonym charakterze neuroprotekcijnym. Jest szeroko rozpowszechniony w neuronach centralnego i autonomicznego układu nerwowego, w tym również w przewodzie pokarmowym, gdzie, podobnie jak VIP, uważany jest za ważny neurotransmitter. PACAP, 38-aminokwasowy neuropeptyd należący do rodziny sekretyna-glukagon-VIP, pełni różnorodne funkcje, modulując nie tylko działanie ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego lecz także układu immunologicznego, wpływając na produkcję wielu cytokin [41, 122]. Wykazano, że w komórkach ENS, PACAP niemal zawsze współwystępuje z VIP. Peptyd ten ponadto występuje także w znacznej części neuronów zawierających NOS [168].

Badania nad fizjologicznym znaczeniem tego transmittera, podobnie jak i wielu innych, prowadzone są głównie na zwierzętach. Badano rolę PACAP w etiopatogenezie wybranych schorzeń neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, uszkodzenia narządów lub układów, gdzie dochodzi do zajęcia nerwów, neuropatii w przebiegu AIDS, nefropatii cukrzycowej, autyzmie, zawale mięśnia sercowego, zapaleniu trzustki czy też astmie oskrzelowej [41, 60, 126].

Badania Sokołowskiej i wsp., prowadzone *in vitro*, wykazały, że PACAP zapobiega apoptozie neuronów OUN indukowanej wieloma czynnikami, między innymi etanolem, prionami, niedoborem jonów K<sup>+</sup>, czy też wysokimi stężeniami glutamianu. Badania *in vivo* na modelach niedokrwienia i choroby Parkinsona potwierdziły neuroprotektoryjne właściwości PACAP. Działanie anty-apoptotyczne może odbywać się bezpośrednio, drogą transdukcji sygnału, lub też poprzez inne komórki, które uwalniają odpowiednie substancje. Uważa się, że PACAP, podobnie jak i VIP, mogą być kluczowe dla przyszłej terapii chorób neurodegeneracyjnych (np. stwardnienie rozsiane), czy też schorzeń autoimmunologicznych, a także chorób przewodu pokarmowego [122, 234].

Ciekawym spostrzeżeniem dzieli się w swoim doniesieniu Dilek Dogrukol-Ak w 2004 r., sugerując możliwość przechodzenia przez barierę krew-mózg peptydów z rodziny VIP/PACAP/sekretyny. Otwierać to może nowe horyzonty umożliwiające zrozumienie efektów obwodowo dostarczanych peptydów do OUN. Stwierdził on, że istnieje duża szansa, że te peptydy mogą stać się użyteczne w leczeniu pewnych schorzeń neurologicznych [60, 126].

#### **4.2.3. Zadania ENS w procesach fizjologicznych i patologicznych przewodu pokarmowego**

Zapalenie jelit jest związane z zaburzeniami perystaltyki w jelicie i zaburzeniami ze strony ENS. Neuronalne łuki odruchowe opierają się o połączenia pomiędzy splotem mięśniówkowym a podśluzówkowym, w ten sposób koordynując w stanach zapalnych jelit wydzielanie śluzówkowe ze zwiększeniem motoryki. Wiele toksyn bakteryjnych i wirusowych aktywuje neurony jelitowe, co prowadzi do zwiększonej sekrecji jako mechanizmu obronnego, na przykład w ostrym zapaleniu jelit wywołanym przez toksynę *A Clostridium difficile* pobudzeniu ulegają neurony jelitowe, a aktywność neuronów układu współczulnego, które w warunkach prawidłowych hamują aktywność komórek ENS, jest hamowana [49, 141, 164].

Połączenie mózgu z mastocytami, drogą nerwową, której struktury morfologicznej nie udało się jeszcze wyjaśnić wydaje się być mechanizmem, który koreluje stany psychoemocjonalne z podrażnieniami jelit. ENS odbiera sygnał z mastocytów jako zagrożenie i wywołuje program oparty o wzrost wydzielania i zwiększenie motoryki, w celu szybkiego i efektywnego usunięcia zagro-

zenia. Skutkuje to zaburzeniami funkcjonalnymi ze strony żołądka i jelit, takimi jak dyspepsja funkcjonalna i zespół jelita drażliwego (IBS) [34, 256].

U niektórych pacjentów z IBS wzrasta średnia liczba komórek układu immunologicznego oraz komórek prozapalnych w błonie śluzowej jelita grubego, szczególnie w okolicy pni nerwowych. Badania nad pochodzeniem regularnych skurczów jelitowych doprowadziły do odkrycia regionów rozrusznikowych wolnych fal perystaltycznych, które zlokalizowane są na granicy mięśniówki i warstwy podśluzówkowej mięśni okrężnych, zbudowanych z sieci komórek zwanych komórkami Cajala [96, 240]. Komórki te są populacją komórek mięśniopodobnych. Kontaktują się one ze sobą, z komórkami mięśniowymi i końcówkami nerwów i działają nadając tempo pracy mięśni przewodu pokarmowego poprzez inicjację rytmicznej aktywności elektrycznej.

Komórki Cajala mają receptory zarówno dla transmittera hamującego (tlenek azotu) jak i dla tachykininowych transmittarów pobudzających, stwierdza się u nich także receptory muskarynowe i receptory dla VIP. Konsekwencją utraty lub defektu komórek Cajala jest nieprawidłowa perystaltyka [96].

Coraz bardziej staje się prawdopodobne, że reakcja autoimmunologiczna na elementy ENS może być przyczyną objawów przypominających IBS, a mogących prowadzić do przewlekłej jelitowej pseudoniedrożności. Zaburzenia perystaltyki często są wynikiem neuropatii. Pierwotnie genetyczne neuropatyczne zaburzenia jelitowe i utrata hamujących neuronów motorycznych powoduje zaburzenia perystaltyki w takich schorzeniach jak: choroba Hirschsprunga, achalazja, zespół jelita drażliwego, przerozowa stenoza odźwiernika, refluksowe zapalenie przełyku, przewlekłe jelitowe pseudozaparcia, dyspepsia nie-wrzodowa i zaparcia wywołane wolnym tranzytem jelitowym (*slow transit*) [55, 96, 257].

Zrozumienie mechanizmów regulujących wydzielanie dało pogląd na procesy zachodzące w zaparciach i biegunkach [153].

ENS wpływa na funkcję nabłonków jako bariera i alarmowy system obronny. Stymulacja pola elektrycznego ENS powoduje odpowiedź wydzielniczą [49]. Odruchy wydzielniczo-ruchowe są inicjowane fizjologicznie przez oddziaływanie chemiczne i mechaniczne zawartości światła jelita. Ważnym czynnikiem fizjologicznym stymulującym wydzielanie wydaje się być aktywny transport substancji odżywczych, między innymi glukozy [49, 70, 141].

Efekt wydzielniczy ma miejsce nie tylko w obrębie nabłonka jelit, ale występuje również w innych częściach jelita w wyniku dośrodkowego odruchu, który wywołuje nasiloną aktywację ENS. Odruchy te mają zintegrowane obwody składające się z neuronów czuciowych, których zakończenia znajdują się w splocie mięśniówkowym i podśluzówkowym i mają za zadanie sprzęgać zwrotnie neurony sekreto-motoryczne z komórkami w zwoju podśluzówkowym.



Wydaje się, że neurony niecholinergiczne przekazują większość lokalnych odruchów, używając tachykinin (np. substancji P) i VIP jako pierwotnych przekaźników. Acetylocholina (ACh) i VIP wiążą się z receptorami komórek nabłonkowych i stymulują sekrecję płynu i chlorków oraz hamują absorpcję sodu [96]. Wiele substancji, a wśród nich PACAP i kwas glutaminowy modulują aktywność neuronów sekretomotorycznych. W ten sposób wzmacniają lub hamują sekrecję jonów i wody [49, 70, 141, 247].

ENS odgrywa znaczącą rolę w patogenezie zmian naczyniowych obserwowanych w licznych chorobach, takich jak: nadciśnienie, cukrzyca, niedoczynność tarczycy, angiodysplazja, guzy, powikłania po napromienianiu, angina brzuszna i martwica jelit [94]. Badania, mające na celu wykazanie związku pomiędzy powstaniem, rozwojem i zejściem procesów patologicznych w organizmie człowieka, a zachowaniem się neuropeptydów, rozpoczęto pięć lat temu. Trwają więc intensywne prace w laboratoriach całego świata, zmierzające do udzielenia odpowiedzi na szereg pytań, z których najważniejsze brzmi: – czy można stosować neuropeptydy (lub ich analogi) w radykalnej, bądź też wspomagającej terapii w procesach chorobowych, w które zaangażowany jest jelitowy układ nerwowy.

Silne interakcje między ENS i układem immunologicznym są dowiedzione faktem istnienia receptorów dla jelitowych neurotransmiterów na komórkach kępek Peyera i limfocytach znajdujących się w lamina propria. Odpowiedź sekrecyjna i motoryczna przewodu pokarmowego, głównie jelit, jest zależna od specyficznych antygenów (np. pasożytów, jedzenia i toksyn bakteryjnych) i wyzwalana przez bezpośrednią komunikację między układem immunologicznym i ENS [38].

Szybki postęp w tworzeniu łatwo dostępnych i wiarygodnych metod badawczych *in vivo* umożliwia obecnie dogłębne poznanie roli ENS w stanach fizjologii i patologii jelita grubego u ludzi. Biorąc pod uwagę coraz dokładniejszą wiedzę o ENS, liczne w ostatnich latach pytania o jego rolę w regulacji wielu czynności przewodu pokarmowego w stanach zdrowia i choroby, wydaje się, że dalsze badania w tej dziedzinie doprowadzą do przybliżenia naszej wiedzy o patogenezie i nowych metodach terapii w nieswoistych zapaleniach jelit. W badaniach nad układem nerwowym w przewodzie pokarmowym już został poczyniony ogromny postęp i coraz powszechniejsza staje się świadomość wpływu ENS na funkcje układu pokarmowego w czasie zdrowia i choroby. Przełom dla nowych metod leczenia i modyfikacji prewencyjnych wielu chorób przewodu pokarmowego leży pomiędzy niewyjaśnionymi sekretami działania ENS i osi mózg-jelita [97, 240, 256].

Z powyższych danych wynika, że długotrwałe zaburzenia neuroimmunoregulacji mogą (i powinny) być rozpatrywane jako podstawowy czynnik etiopatogenetyczny przewlekłych chorób zapalnych. Jednakże nadal nie wiadomo, jaki jest wpływ powstających nieprawidłowości w sy-

stemie nerwowym jelit i produkowanych w wyniku tego neurotransmiterów w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit.

#### **4.2.4. Rola jelitowego układu nerwowego w procesach zapalnych jelit**

Ostatnie lata przyniosły wiele istotnych danych dotyczących zmian w jelitowym układzie nerwowym w przebiegu IBD. Aczkolwiek stosunkowo dużo wiadomo o morfologii, neurochemizmie i funkcjach ENS w warunkach fizjologicznych, lecz brak jest danych uzyskanych w trakcie procesów chorobowych, w tym IBD, gdzie dotychczasowa wiedza jest przyczynkowa. Z powodu wielu trudności w przeprowadzeniu badań randomizowanych w tej grupie chorych, większość doniesień dotyczy doświadczeń na zwierzętach.

Wiedza dotycząca cech morfologicznych i neurochemicznego kodowania neuronów śródściennych zwojów jelitowych świni jest stosunkowo obszerna i świadczy o ogromnym podobieństwie do obrazu jelitowego układu nerwowego, obserwowanego u człowieka [31, 102, 159, 160]. Ze wspomnianych badań wynika, iż w neuronach zwojów jelitowych świni, oprócz innych biologicznie aktywnych substancji (serotonina, noradrenalina czy też acetylocholina) występują liczne neuropeptydy, jak na przykład: VIP, NPY, substancja P (SP), peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP), GAL, somatostatyna (SOM), enkefalin, PACAP i inne.

Wykazano, iż koncentracja niektórych neuropeptydów w ekstraktach ściany zmienionego zapalnie jelita grubego, bądź też w neuronach pozajelitowych, zaopatrujących te odcinki przewodu pokarmowego ulega zasadniczym i znaczącym zmianom. Między innymi stwierdzono znaczne zmniejszenie koncentracji VIP i CGRP [224, 165].

Intensywne badania udowodniły ponadto, iż GAL reguluje skurcze jelit i modyfikuje jonowy transport nabłonkowy w jelitach, prawdopodobnie odgrywając dużą rolę w biegunkach pochodzenia zapalnego [17]. CGRP odgrywa rolę ochronną w odniesieniu do błony śluzowej w przebiegu zapaleń jelita grubego, a VIP i SP odgrywają zasadniczą rolę w powstawaniu, rozwoju i trwaniu procesu zapalnego w przypadkach wrzodziejącego zapalenia okrężnicy jelita grubego u człowieka [165, 176, 202].

Dogłębne poznanie mechanizmów udziału neuropeptydów w przytoczonych powyżej przykładach stwarza uzasadnione nadzieje, iż w przyszłości możliwe będzie stosowanie środków farmakologicznych działających poprzez receptory neuropeptydowe [105].

ENS jest odpowiedzialny za kontrolę wszystkich bez mała funkcji przewodu pokarmowego. Z uwagi na te niezwykle istotne zadania, pozostaje w swojej budowie stosunkowo niezmienny w warunkach, w których zaburzona jest nawet architektura jelita, jak choćby w trakcie IBD, co świadczy o niezwykle wydajnych mechanizmach kompensacyjnych. Do chwili obecnej zmiany w kodowaniu chemicznym neuronów obserwowane były jedynie w modelach zwierzęcych.

Dotyczy to zarówno wzmożenia, jak i hamowania ekspresji neurotransmiterów, ale także aktywacji genów, które w warunkach zdrowia pozostają w neuronach ENS w stanie supresji. Dobrze udokumentowana jest odpowiedź neuronów na stan zapalny. Nie ustalono jeszcze co prawda, czy jest to wyraz krótkotrwałej odpowiedzi czynnościowej czy też długotrwałych zmian w fenotypie neuronów (lub obu dopełniających się mechanizmów jednocześnie). Wiadomo, że neurony jelitowe są bardzo plastyczne w odpowiedzi na zapalenie [227].

Coraz lepiej poznano organizację i funkcjonowanie ENS, który, mimo swojej przynależności do układu autonomicznego, przypomina OUN, zarówno pod względem neurochemii, organizacji połączeń neuronalnych, mechanizmów działania elementów glijowych i braku kolagenu. Analogicznie do zaburzeń w OUN, można oczekiwać, że różne dysfunkcje ENS będą leżały u podłoża chorób gastroenterologicznych.

Kilkanaście lat temu rozpoczęto eksperymenty polegające na przecinaniu (aksotomii) bądź miażdżeniu nerwów obwodowych. Stwierdzono, że w przypadkach zaburzenia transportu neurotransmiterów poprzez aksony komórki nerwowej uszkodzone nerwy reagują na taki uraz w sposób charakterystyczny i typowy. Zjawisko to nazwano plastycznością układu nerwowego. Po tych odkryciach już tylko kwestią czasu pozostało rozpoczęcie nowej ery badań nad zmieniającą się ilością i rodzajem neuropeptydów w poszczególnych elementach układu nerwowego w przebiegu najróżnorodniejszych stanów patologicznych [56].

Pod pojęciem plastyczności neuronalnej określa się adaptację systemu nerwowego, w tym również jego części jaką stanowi ENS, na różne uszkodzenia czy zmiany funkcjonalne w przewodzie pokarmowym. Jest to złożony proces obejmujący zmiany w pobudliwości neuronów, ekspresji neurotransmiterów, a nawet zmiany w architekturze połączeń neuronalnych. Procesy te mogą być przejściowe, w odpowiedzi na bodziec (np. w przypadku miażdżenia pnia nerwowego) lub trwale (w następstwie ciężkich urazów lub przewlekłych patologii) [152].

Według Lin i wsp., neuronalna plastyczność ENS jest prawdopodobnie kluczem do jelitowej adaptacji na jego wzrost, dojrzewanie i starzenie się, oraz różnego rodzaju chorobowe procesy patologiczne [148].

Wykazano, iż zawartość niektórych neuropeptydów w ścianie jelita grubego, bądź też w neuronach pozajelitowych zaopatrujących te odcinki przewodu pokarmowego, ulega zasadniczym i znaczącym zmianom w przebiegu stanu zapalnego [8, 78, 190].

Podsumowując, plastyczność ENS jest cechą stanu zapalnego jelit. Wyjaśnienie mechanizmów, za pomocą jakich proces zapalny wpływa na jelitową kontrolę neuronalną funkcji przewodu pokarmowego może doprowadzić do powstania nowych sposobów leczenia IBD [152].

Wydaje się, jak podkreślane jest w doniesieniach, że istotnie na zaburzenia w plastyczności zwojów i splotów nerwowych jelita grubego oraz ekspresji poszczególnych neurotransmiterów, szczególnie o działaniu neuroprotekcyjnym, mają wpływ między innymi takie patogeny, jak pałeczki beztlenowe, izolowane z kału chorych cierpiących na UC. Proces ten wiąże się również z ekspresją czynników pro-i przeciwzapalnych, z których cytokiny wydają się odgrywać najważniejszą rolę [1].

Wydaje się to niezwykle istotne w świetle ostatnich badań, wykazujących niezbitą interakcję takich neurotransmiterów jak VIP (którego podwyższoną ekspresję obserwowano w zwojach jelita w trakcie CD) z czynnikami prozapalnymi (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) i cytokiną immunostymulacyjną IL-12. Wpływa on hamująco na w/w cytokinę, jednocześnie wzmagając produkcję i uwalnianie czynników przeciwzapalnych, takich jak IL-10. Co więcej, wykazano także, iż pod wpływem stanu zapalnego zwoje jelitowe są zdolne per se do produkcji i uwalniania szerokiego wachlarza cytokin [35, 63].

W przypadkach, kiedy czynnik sprawczy trudny jest do ustalenia, a także u opornych na leczenie pacjentów wydaje się zasadne pytanie, czy ocena stanu ENS może pomóc w procesie diagnostycznym, lub też ukierunkować terapię w zależności od różnych stopni zaawansowania stanu zapalnego jelit.

## 5. Cel pracy

Na podstawie dotychczas opublikowanych prac klinicznych z zakresu badań nad patogenezą nieswoistych zapaleń jelit nie można w pełni ustalić zarówno pierwotnej przyczyny rozwoju przewlekłego zapalenia, jak i mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację i podtrzymywanie toczącego się w tkankach procesu zapalnego. Wyniki badań dotyczących etiopatogenezy nieswoistych zapaleń jelit są niespójne, a często rozbieżne.

Badania przeprowadzone w ostatnich kilku latach dostarczyły niepodważalnych dowodów co do udziału bakterii, (głównie beztlenowych), w aspekcie ich uszkadzającego działania na kolonocyty jelita poprzez wytwarzanie głównie przez bakterie redukujące siarkę związków toksycznych. Ich zgubny wpływ na śluzówkę jelita prowadzi do procesów destrukcyjnych zachodzących na jej terenie. Jaka jest odpowiedź jelita i jakie dalej, a może jednocześnie zachodzą tam procesy? Niewątpliwie mamy wówczas do czynienia z odpowiedzią immunologiczną. Kiedy i w tym zakresie dochodzi do nierównej walki pomiędzy cytokinami prozapalnymi, przeciwzapalnymi i immunomodulacyjnymi?

Od kilku lat jednym z wielu obszarów stanowiących przedmiot intensywnej penetracji naukowej dotyczącej niektórych procesów zachodzących w stanach zapalnych jelit jest zachowanie jelitowego układu nerwowego z jego aktywnością w zakresie zwojów jelitowych oraz neuropeptydów (=substancji transmisyjnych komórek nerwowych). Prawie cała wiedza w tym względzie została osiągnięta głównie na podstawie eksperymentalnie wywoływanych stanów zapalnych jelit u zwierząt. Nasuwa się pytanie o roli ENS w powstawaniu, rozwoju i zejściu szeregu procesów patologicznych w jelicie u człowieka.

Układ immunologiczny i ENS są potężną barierą śluzówki jelita. Silne interakcje między ENS i układem immunologicznym są dowiedzione faktem istnienia receptorów dla jelitowych neurotransmiterów na kępkach Peyera i limfocytach znajdujących się w lamina propria. Odpowiedź sekrecyjna i motoryczna śluzówki jelita jest zależna od specyficznych antygenów (np. pasożytów, pokarmów i toksyn bakteryjnych) i wyzwalana przez bezpośrednią komunikację między układem immunologicznym i ENS.

Zapalenie jelit jest związane z zaburzeniami perystaltyki w całym jelicie i zaburzeniami ze strony ENS. Układ neuronalny zawiera połączenia pomiędzy splotem mięśniówkowym i podśluzówkowym, które koordynują wydzielanie śluzówkowe ze zwiększeniem motoryki w stanach zapalnych jelit.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej – określić przydatność oznaczania składu śluzówkowej flory beztlenowej jelita grubego u chorych z IBD i ewentualnego leczenia antybiotykami, probiotykami, neuropeptydami i/lub ich pochodnymi. Ponadto praca może uzupełnić naszą wiedzę o patogenezie przewlekłych chorób zapalnych jelit o nowe aspekty, (nie badane dotychczas

u dzieci), a związane z funkcjonowaniem w tych stanach jelitowego układu nerwowego.

Celem niniejszej pracy jest więc ocena zależności i wzajemnego oddziaływania między sobą kilku czynników mających bezsporny udział w procesie zapalnym jelit, a mianowicie czynnika immunologicznego, bakteryjnego oraz zaangażowania się w ten proces jelitowego układu nerwowego.

**W związku z tym założono następujące cele pracy:**

1. ocenę ilościową włókien nerwowych i neuronów jelitowego układu nerwowego zawierających neurotransmitery protekcyjne (GAL, VIP, PACAP) u pacjentów z UC zarówno w śluzówce jak i w ścianie jelita grubego
2. ocenę zawartości mRNA w śluzówce jelita grubego i stężenia w surowicy krwi wybranych cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych i immunostymulacyjnych u dzieci chorych na UC
3. ocenę w hodowli wycinków śluzówki jelita grubego flory jelitowej u dzieci chorych na UC, ze szczególnym uwzględnieniem obecności szczepów beztlenowych
4. ocenę zmian zachodzących w jelitowym układzie nerwowym w stosunku do miejscowej odpowiedzi immunologicznej oraz czynników bakteryjnych w różnych stadiach zaawansowania schorzenia, czasu trwania choroby i stosowanej terapii.

## 6. Materiał i metody

Badaniami objęto 45 pacjentów.

Chorych podzielono na następujące grupy:

- grupa I – pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (N=33)
- grupa Ia – pacjenci po kolektomii (N=7 z grupy I)
- grupa II – pacjenci, u których na podstawie badania koloskopowego i histopatologicznego wykluczono IBD (N=9, grupa porównawcza)
- grupa III – pacjenci bez zmian zapalnych jelita grubego, u których przeprowadzono resekcję jelita grubego z powodu ostrych przyczyn chirurgicznych (N=3, grupa porównawcza)

Chorzy z grupy I, Ia, II, obserwowani byli w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 2003-2005.

U 7 dzieci, (grupa Ia), które miały przeprowadzoną kolektomię/proktokolektomię w Klinice Chirurgii Dziecięcej i Transplantacji Narządów IP-CZD w Warszawie-Międzylesiu oraz oddziale Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Szpitala Miejskiego w Gdyni pobrano usunięty fragment jelita do oceny w zwojach komórek pozytywnych, gęstości włókien w mięśniówce i włókien immunoreaktywnych w śluzowce zawierających neurotransmitery protekcyjne GAL, VIP i PACAP.

Materiał grupy III uzyskano z Kliniki Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży AMG oraz oddziału Chirurgii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku.

Analizie poddano dane uzyskane z dokumentacji medycznej (historie choroby) pacjentów, w trakcie której oceniano dane z wywiadu, badania przedmiotowego i badań dodatkowych (OB, CRP, morfologia krwi, płytki krwi i fibrynogen, poziom albumin w surowicy, badania bakteriologiczne, immunologiczne i endoskopowe).

Aktywność choroby u dzieci oceniono na podstawie zmodyfikowanej przez polskich autorów skali punktowej (Tab. 1)

**Tab. 1. Ocena aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego według skali Truelove-Wittsa w modyfikacji Ryżki i Wojnarowskiego**

**Tab. 1. The assessment of ulcerative colitis activity after Truelove-Witt scale according to modification by Ryżko and Wojnarowski**

Objaw <i>symptom</i>	0 pkt	1 pkt	2 pkt
Stolce biegunkowe <i>loose stool</i>	<2	2-6	>6
Krew w stolcach <i>bloody stool</i>	brak <i>none</i>	ślady <i>a trace</i>	dużo <i>much</i>
Temperatura <i>temperature</i>	norma <i>normal</i>	<38 <sup>0</sup> c	>38 <sup>0</sup> c
Stężenie hemoglobiny <i>hemoglobin level</i>	>12 g/dl	10-12 g/dl	<10 g/dl
OB <i>sedimentation rate</i>	<10	10-30	>30
Wskaźnik Cole'a <i>Cole Index</i>	>85%	80-85%	<80%

Ocena aktywności choroby

*Disease activity:*

0-4 pkt. – postać łagodna *mild activity*

5-8 pkt. – postać umiarkowana *moderated activity*

9-12 pkt. – postać ciężka *high activity*

Stan odżywienia dzieci określano wykorzystując wartości wskaźnika Cole'a

*Nutritional state based on Cole 's Index:*

$$I\% = \frac{\text{masa ciała} \times \text{długość ciała standardowa}^2}{\text{masa ciała standardowa} \times \text{długość ciała}^2} \times 100$$

$$I\% = \frac{\text{body mass} \times \text{standard body length}^2}{\text{Standard body mass} \times \text{body length}^2} \times 100$$

Wartości wskaźnika Cole'a wyrażone w procentach pozwalają na następującą kwalifikację stanu odżywienia dziecka

90-110 – norma *normal*

85-90 – nieznaczne niedożywienie *mild malnutrition*

75-85 – niedożywienie *malnutrition*

<75 – wyniszczenie *cachexia*



**Tab. 2. Wskaźnik zmian endoskopowych (EI) wg Rachmilewiza****Tab. 2. The index of endoscopic changes (EI) after Rachmilewitz**

Rodzaj zmiany <i>Type of change</i>	Punktów <i>Points</i>	
Granulacja bł. śluzowej <i>Mucous granulation</i>	nie <i>no</i>	0
	tak <i>yes</i>	1
Rysunek naczyniowy <i>Vessels feature</i>	prawidłowy <i>normal</i>	0
	nieco zatarty <i>partially decreased</i>	1
	zupełnie zniesiony <i>totally decreased</i>	2
Ranliwość bł. śluzowej <i>Mucous damage</i>	brak <i>none</i>	0
	nieco wzmożona <i>increased</i>	2
	znacznie wzmożona <i>severely increased</i>	4
Powierzchnia bł. śluzowej (śluz, ropa, owrzodzenia, nadżerki) <i>Mucous surface (mucus, pus, ulcers, erosions)</i>	brak <i>none</i>	0
	słabo nasilone zmiany <i>mild changes</i>	2
	znacznie nasilone <i>zmiiany severe changes</i>	4

Ocena aktywności endoskopowej:

<6 pkt. lekkie nasilenie zmian, *mild changes*

>6 pkt. umiarkowane i znaczne nasilenie zmian

W ocenie kryteriów zaawansowania zmian w obrazie histopatologicznym zastosowano wskaźnik aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego według Maiera i wsp [187].

Przed wykonaniem badania kolonoskopowego, oceniany był stan pacjenta przez pediatrę i anesteziologa (badania wykonywane były w analgo-sedacji), rodzice lub prawni opiekunowie dziecka po poinformowaniu o celowości i technice badania oraz ewentualnych możliwościach powikłań wyrażali pisemną zgodę na wykonanie badań.

### **Pobieranie materiału podczas badania kolonoskopowego**

Badanie endoskopowe dolnego odcinka przewodu pokarmowego tzw. pełna kolonoskopia wykonywane było przy pomocy kolonoskopu CF-VI firmy OLYMPUS. Wycinki zostały pobrane rutynowo ze zmienionych zapalnie fragmentów śluzówki jelita grubego, głównie z kątnicy, a następ-

nie utrwalone w 8% wodnym roztworze zbuforowanej formaliny. Po utrwaleniu pobrane wycinki z wyjątkiem jednego zostały poddane typowej obróbce histologicznej i zatopione w blokach parafinowych, a następnie skrojone na mikrotomy. Uzyskane skrawki zostały zabarwione metoksyliną i eozyną. Tak uzyskane preparaty były oceniane przez histopatologa w mikroskopie optycznym. Jeden wycinek histopatolog utrvalał w utrwalaczu Zamboni'ego, był on poddawany procedurze immunohistochemicznej celem przygotowania wycinka do oceny obecności neuroprotektynowych transmiterów terminalnych (procedura opisana poniżej). Z dwóch pobranych wycinków jelita grubego w jednym oceniano zawartość cytokin, a procedura opisana została poniżej (zgoda Komisji Bioetycznej). Drugi wycinek do badań mikrobiologicznych (wykonywanych u pacjentów z podejrzeniem IBD rutynowo) umieszczano na beztlenowym podłożu transportowym (Port-A-CUI; firmy BBL) i natychmiast dostarczano do Zakładu Bakteriologii Klinicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku (Kierownik Zakładu dr J. Kurlenda)

### **Ocena zawartości cytokin w pobranych biopsjach ściany jelita grubego**

Natychmiast po uzyskaniu biopsji został on dokładnie zważony, co umożliwiło porównywanie bezwzględnych ilości cytokin. Następnie próbka została umieszczona w odpowiedniej objętości buforu Tris-HCl (0,05 M buforze Tris-HCl pH 7,4; 0,5 µg tkanki/1 ml buforu zawierający 0,5 mM ditiotritol i 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu w celu ochrony grup siarczkowych cytokin oraz 10 µg/ml leupeptyny w celu inaktywacji proteaz mogących rozkładać cytokiny) i natychmiast zamrożona w temp. ciekłego azotu. Próbkę były przechowywane w temp. -80°C, a po rozmrożeniu wycinek został zhomogenizowany w buforze o opisanym powyżej składzie. Próbkę zostały zwirowane w 30000 g przez 20 min, a następnie rozporcjowane po 250 µl zamrożone w -80°C do czasu oznaczeń zawartości cytokin.

Stężenie i czystość wyizolowanego RNA z biopsji określano metodą spektrofotometryczną. Stężenie RNA wyrażano w µg/µl. Poziomą ekspresję badanego genu cytokiny wyrażony został jako odsetek ekspresji genu β-aktyny obecnej w materiale biopsyjnym od tego samego pacjenta. Ekspresję określano przez stosunek stężenia mRNA badanej cytokiny do stężenia mRNA β-aktyny.

Ilość cytokin w surowicy oznaczana w pg/ml została określona metodą immunoenzymatyczną ELISA przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów firmy PharMingen lub R&D. Pacjentom pobierano 5 ml krwi żyłnej do sterylnej probówki na skrzep (Zgoda Komisji Bioetycznej). Dane umieszczone w tabelach i przedstawione na rycinach wyrażają średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe (SD).

Badania wykonano w Katedrze Histologii i Immunologii AM w Gdańsku (Kierownik Katedry: prof. dr hab. Andrzej Myśliwski)

Wybór cytokin oznaczanych w niniejszej pracy wynikał z kilkuletnich badań prowadzonych z zespołem Katedry Histologii i Immunologii AM w Gdańsku pod kierunkiem Prof. Z. Kmiecia.

### **Procedury mikrobiologiczne**

Jeden z wycinków śluzówki jelita grubego pobranych w trakcie kolonoskopii wykonywanej ze wskazań lekarskich w celach diagnostycznych lub kontrolnego badania w trakcie leczenia UC umieszczano w podłożu transportowym (Port-A-CUI; firmy BBL) i dostarczano do laboratorium bakteriologicznego. Materiał ten następnie był wysiewany na świeżo przygotowane podłoża: Columbia blood agar (Oxoid) i wzbogacony bulionem tioglikolanowym (BBL) z dodatkiem witaminy K i heminy. Posiane płytki umieszczane były w torebkach ze środowiskiem beztlenowym (BBL) i inkubowane od 24 do 48 godzin w temperaturze 37°C. Po tym czasie kolonie różniące się morfologicznie przesiewane były na płytki z podłożem blood agar, które inkubuje się równolegle w warunkach tlenowych i beztlenowych. Codziennie przeglądane były posiewy w bulionie tioglikolanowym. Namnożone bakterie (o czym świadczy zmętnienie podłoża) wysiewa się na płytki z podłożem Columbia blood agar i dalej postępuje jak w przypadku drobnoustrojów wyrosłych z posiewów bezpośrednich. Czyste izolaty, wyrosłe tylko w warunkach beztlenowych były identyfikowane na paskach API 20A (firmy bioMerieux). Jednocześnie wykonywane były preparaty barwione metodą Grama. Wykonywano również posiewy kału metodą standardową w kierunku bakterii patogennych z uwzględnieniem flory beztlenowej. Badania wykonano w Zakładzie Bakteriologii Klinicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku.

### **Procedura immunohistochemiczna**

Badania oparte były o ocenę wzorów rozmieszczenia i kodowania chemicznego neuronów trzech zwojów śródściennych jelita w wycinkach całej ściany jelita u pacjentów po kolektomii w przebiegu colitis ulcerosa (grupa Ia N=7) i pacjentów z grupy porównawczej (grupa III N=3) operowanych z powodu niedrożności jelit. Materiał do oceny pobrany był z jelita resekowanego po zabiegu kolektomii. Pobranie materiału z tkanek pooperacyjnych do badania (pobierano 2 cm wycinki jelita) nie wpływało na decyzję chirurga co do rozległości wykonanej resekcji.

Ocenę włókien nerwowych oznaczano w bioptatach jelita pobieranych w trakcie kolonoskopii u pacjentów z UC (grupa I badana N=33) i pacjentów zaliczonych do grupy porównawczej (grupa II N=9), u których na podstawie badania endoskopowego i obrazu mikroskopowego jelita wykluczono IBD. Badanie endoskopowe dolnego odcinka przewodu pokarmowego, diagnostyczne lub kontrolne w trakcie leczenia, wykonywano było ściśle ze wskazań ustalanych przez lekarza gastroenterologa. Wycinki rutynowo pobierano ze śluzówki zmienionych odcinków jelita, a następnie utrwalano w formalinie i poddano ocenie histolo-

gicznej. Z pobranego materiału jeden wycinek utrwalano przez 2 godziny w utrwalaczu Zamboniego. Po tym czasie wycinek jelita poddany został intensywnemu płukaniu 0,9% roztworem NaCl w 0,1 M buforze fosforanowym (3 dni) a następnie w 18% roztworze sacharozy. Po przepojeniu skrawka tym ostatnim, został on skrojony i poddany rutynowym barwieniom immunochemicznym. Do barwień użyte zostały komercyjne przeciwciała mono- i poliklonalne. Przeciwciała wtórne sprzężone są z odpowiednimi fluorochromami (FITC, CY-3, AMCA, odpowiednie fluorochromy z serii Alexa).

Skrawki barwiono przy użyciu rutynowej techniki pośrednich barwień immunofluorescencyjnych w kierunku wykazania obecności struktur nerwowych zawierających PACAP, VIP lub GAL

- a. Ocena liczebności włókien PACAP-, VIP-lub GAL-immunoreaktywnych w biopatach śluzówki jelita: obserwacje przeprowadzano na 4 losowo wybranych skrawkach biopatu jelita każdego pacjenta, nie bliższych sobie niż 80 mikrometrów. Za każdym razem analizowano trzy losowo wybrane pola widzenia na skrawku. Obliczono średnią liczbę włókien na skrawku, a następnie średnią ze średnich dla pacjenta. Wszystkie obserwacje przeprowadzono z użyciem obiektywu 40x.
- b. Ocena liczebności włókien w mięśniówce oraz gęstości włókien GAL-, VIP- lub PACAP-pozytywnych w obrębie zwojów mięśniówkowego (MP; Auerbacha), podśluzówkowego zewnętrznego (OSP; Schabadascha) i podśluzówkowego wewnętrznego (ISP; Meissnera) w wycinku ściany jelita uzyskanego w trakcie kolektomii. W przypadku każdego pacjenta barwienia wykonano na trzech skrawkach wycinka jelita oddalonych od siebie o co najmniej 100 mikrometrów. na każdym skrawku, na trzech losowo wybranych polach widzenia liczono liczbę włókien w mięśniówce (pod obiektywem 40x).
- c. Procent komórek VIP-, GAL- lub PACAP- pozytywnych w obrębie zwojów ściany jelita (MP; Auerbacha), (OSP; Schabadascha), (ISP; Meissnera) w wycinkach uzyskanych w trakcie kolektomii: na każdym skrawku liczono procent komórek VIP-, GAL- lub PACAP-pozytywnych wśród wszystkich komórek zwojowych w odpowiednio zwoju MP, OSP oraz ISP. Komórki i włókna negatywne były ciemne zaś pozytywne były jasne.

Wybarwione preparaty analizowano przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX51 wyposażonego w kamerę cyfrową i oprogramowanie AnalySIS ver. 3.2. Uzyskane obrazy wydrukowano za pomocą drukarki stałotramentowej Phaser DP8200. Koszt badania trzech przełączników u jednego pacjenta wynosi 102 PLN, (jeden neuromediator – 34 PLN)

Badania wykonano w Zespole Fizjologii Klinicznej Katedry Morfologii Funkcjonalnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem Prof. dr hab. M. Majewskiego.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

**Tab. 3. Przeciwciała użyte do barwień immunohistochemicznych****Tab. 3. The antibodies used for immuno-histochemical staining**

Antygen	Kod	Gatunek	Rozcień- czenie	Źródło
1	2	3	4	5
Przeciwciała pierwotne				
GAL	Ras-7153N	królik	1:16000	Peninsula, Merseyside, Anglia
PACAP	970737		1:8000	Peninsula
VIP	Z03510		1:8000	AffinitiMamhead Castle, UK
Przeciwciała wtórne				
1			4	5
Biotylinowana kozia anty-królicza IgG			1:800	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Streptawidyna znakowana CY3			1:8000	Dianova, Hamburg, Niemcy

### Zastosowane metody statystyczne

Analiza statystyczna obejmowała analizę opisową i decyzyjną. W skład analizy opisowej weszły prezentacje graficzne i liczbowe otrzymanych wyników. W opisie charakterystyk jakościowych stosowano tablice kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego.

Jako miarę położenia przyjęto średnią i pięć nieparametrycznych charakterystyk Tukey'a (minimum, kwartył 25%, mediana, kwartył 75% i maksimum). Jako miarę rozrzutu przyjęto SD. Wielokrotnie zaszła konieczność rozpatrywania nie tylko kwantyli ćwiartkowych ale dodatkowo kwantyli rzędu 10% i 90%. Przyjęto standardowe oznaczenia przejmując, że  $Q_\alpha$  jest kwantylem rzędu  $\alpha$  (wyrażone w%), Min i Max oznacza odpowiednio minimum i maksimum, a SD SD z próby. Oznaczenie N zarezerwowano dla liczebności grupy lub podgrupy. Wartości kwantylowe  $Q_\alpha$  implikują podział na dwie grupy: pacjentów z wartością cechy poniżej  $Q_\alpha$ , włącznie i tych pacjentów dla których cecha jest wyższa niż  $Q_\alpha$ . Grupy te tradycyjnie oznaczono  $Q_\alpha^-$  i  $Q_\alpha^+$ . Podział ten nazywamy klasyfikacją kwantylową. W przypadku kwantyli rzędu 10% i 90% przynależność do grupy  $Q_{10}^-$  i  $Q_{90}^+$  symbolicznie nazywamy przekroczeniem patologicznym. Podobne oznaczenia zostały przyjęte w przypadku przekroczeń medianowych. Np. PACAP – oznacza grupę pacjentów którzy mają PACAP poniżej mediany (włącznie z nią), a PACAP+ oznacza grupę pacjentów dla których PACAP jest powyżej mediany. Podobną zasadę oznaczeń przyjęto dla innych zmiennych. Wartości statystyk opisowych i z podziałem na grupy badawcze zaprezentowano w tabelach lub w formie prezentacji graficznej.

W zakresie statystycznej analizy decyzyjnej stosowano testy statystyczne. Decyzja o różnicy wartości oczekiwanych lub innych miar położenia

była podejmowana na bazie statystyk nieparametrycznych, głównie stosowany był test U Manna-Whitneya.

W zakresie tablic wielodzielczych zawsze jako pierwsza jest testowana hipoteza niezależności kolejno, za pomocą testu dokładnego Fishera, testu  $\chi^2$  (Pearson Chi-square) i jego modyfikacji ML- $\chi^2$  (Maximized Likelihood Chi-square). W następnym kroku stosowano dwa rodzaje testów dokładnych (exact test). W pierwszym stawiano hipotezę stanowiącą, że zjawisko występuje z częstością nie przekraczającą 5% i odrzucano na poziomie istotności  $p=0,05$ . W drugim, niejako komplementarnym przypadku stawiano hipotezę o tym, że zjawisko występuje w częstości 50% versus 50% i odrzucano na poziomie  $p=0,05$ . Testy dokładne zostały wyprowadzone metodą największej wiarygodności, a wartości krytyczne (oznaczane  $N\alpha$ ) dla poziomu  $p=0,05$  były podawane jako największe wartości krytyczne bez stosowania randomizacji.

Jako regułę przyjęto by przy każdej decyzji zaznaczyć test przy pomocy którego weryfikowano postawioną hipotezę będącą podstawą decyzji, wartość statystyki testowej i poziom istotności odpowiadający błędowi pierwszego rodzaju dla tej hipotezy. W przypadku testów dokładnych dodatkowo wartości empiryczne (oznaczane  $N$  jako liczebność próby w teście). W kilku przypadkach, dla wyników stabelaryzowanych, wartości testowe i poziomy istotności zostały zamieszczone w tej samej tabeli w której znajdują się statystyki opisowe.

W niektórych analizach, gdzie nie można zastosować segmentacji, czy innych technik statystycznych przedstawiono graficznie krzywą regresji i wtedy również został obliczony współczynnik korelacji  $\tau$ -Kendalla. Dodatkowo, w przypadku przemieszczeń międzygrupowych, w trakcie obserwacji badawczych policzone zostały współczynniki niepewności UC.

Jako graniczny poziom przyjęto  $p=0,05$ . W przypadku poziomu istotności mniejszego od 0,001 pisano zawsze  $p<0,001$ . Jeśli poziom istotności był poniżej 0,05 to podejmowano decyzję o istotności różnicy lub częstości.

Obliczenia zostały wykonane z użyciem pakietu statystycznego Statistica 7.1 i MapleV 7.0.

## Literatura

- a. Altman, D. G (2001). Practical Statistics for medical Research, 2nd. ed. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- b. Bickel, J. P. Doksum K.A (2000). Mathematical Statistics. 2nd. ed. Prentice Hall, New Jersey.

## 7. Wyniki

Przedstawiono wyniki badań w następujących grupach:

- grupa I N=33 pacjentów – dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego
- grupa Ia N=7 pacjentów po kolektomii (z grupy I 33 chorych)
- grupa II N=9 pacjentów – pacjenci, u których na podstawie badania koloskopowego i histopatologicznego wykluczono IBD.
- grupa III N=3 pacjentów – pacjenci bez zmian zapalnych jelita grubego, u których przeprowadzono resekcję jelita grubego z powodu ostrej niedrożności jelit (uwięźnięta przepuklina pachwinowa, niedrożność zrostowa, adenocarcinoma)

### I część wyników

Analiza stanu klinicznego chorych na UC, ocena wybranych parametrów morfologicznych, biochemicznych, obrazu endoskopowego i mikroskopowego jelita grubego oraz określenie aktywności choroby w okresie włączenia pacjentów do badania

**Tab. 4. Ogólna charakterystyka badanych grup**  
**Tab. 4. General characteristics of studied groups**

Grupa Group	I		Ia		II		III		Ogółem Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Dziewczęta Girls	17	51,52	7	100,00	6	66,67	2	66,67	25
Chłopcy Boys	16	48,48	0	0,00	3	33,33	1	33,33	20
Ogółem Total	33	100,00	7	100,00	9	100,00	3	100,00	45

W grupie chorych na UC i (N=33) nie stwierdza się różnic w zakresie płci – dziewczęta stanowią 51,52%, natomiast chłopcy 48,48%, natomiast w grupie porównawczej II (N=9) przeważają dziewczęta (66,67%). W grupie Ia (N=7) wyłonionej z grupy I, u których z powodu braku remisji po leczeniu farmakologicznym wykonano pan/proktokolektomię 100% stanowiły dziewczęta. W III grupie porównawczej (N=3) zbadano 2 dziewczynki i jednego chłopca.

**Tab. 5. Średnia wieku w grupach**  
**Tab. 5. Mean age in groups**

Wiek (lata ukończone) Age	Średnia Mean	N	Min	Max
Grupa I Group I	13,7	33	3	19
Grupa Ia Group Ia	15,2	7	13,4	20,8
Grupa II Group II	11,6	9	3	16
Grupa III Group III	10,7	3	6	16
Ogółem Total	13,2	45	3	19

Średnia wieku w badanych grupach wynosi w grupie chorych I (N=33) 13,7 lat (w zakresie od 3,0 do 19,0 lat), a w grupie porównawczej II (N=9) 11,6 lat (w zakresie od 3,0 do 16,0 lat), w grupie Ia (N=7) 15,2 lata (w zakresie od 13,4 do 20,8), w grupie III (N=3) 10,7 lat (zakresie (3 do 19)).

**Tab. 6. Średnia wieku przy podziale na płeć w grupie I i II**  
**Tab. 6. Mean age in groups I and II depending on sex**

Płeć Sex	Gr. I	Średnia Mean	Min	Max	Gr. II	Średnia Mean	Min	Max
Dziewczęta Girls	17	14,4	6,1	19,5	6	15,45	11,8	20,4
Chłopcy Boys	16	13,9	3,8	19,5	3	10,04	3,6	15,5
Ogółem Total	33				9			42

Średnia wieku przy podziale na płeć w grupie I – chorych na UC (N=33) wynosi u dziewcząt 14,4 lat (w zakresie od 6,1 do lat 19,5), u chłopców 13,9 lat (w zakresie od 3,6 lat do 15,5 lat), w grupie II porównawczej (N=9) wynosi u dziewcząt 15,45 lat (w zakresie od 11,8 do 20,4 lat), a u chłopców 10,04 lat (w zakresie od 3,6-15,5 lat)

**Tab. 7. Średnia wieku przy podziale na płeć w grupie Ia i grupie III**  
**Tab. 7. Mean age in groups Ia and III depending on sex**

Płeć Sex	Gr. I	Średnia Mean	Min	Max	Gr. II	Średnia Mean	Min	Max
Dziewczęta Girls	7	15,23	13,4	20,8	2	11,0	6	16
Chłopcy Boys	0	0			1	10,2		
Ogółem Total	7				3			

W grupie Ia, wyłonionej z grupy I – chorych po kolektomii (N=7), średnia wieku przy podziale na płeć wynosi u dziewcząt 15,23 lat (w zakresie od



13,4 do lat 20,8), (dziewczęta stanowiły 100% w tej grupie). W III grupie porównawczej (kolektomia z innych przyczyn chirurgicznych, bez zmian zapalnych w jelicie) – (N=3) zbadano 2 dziewczynki, średnia wieku tych dziewczynek wynosiła 11 lat (w zakresie od 6 lat do 16 lat), a jeden chłopiec z tej grupy miał 10,2 lat.

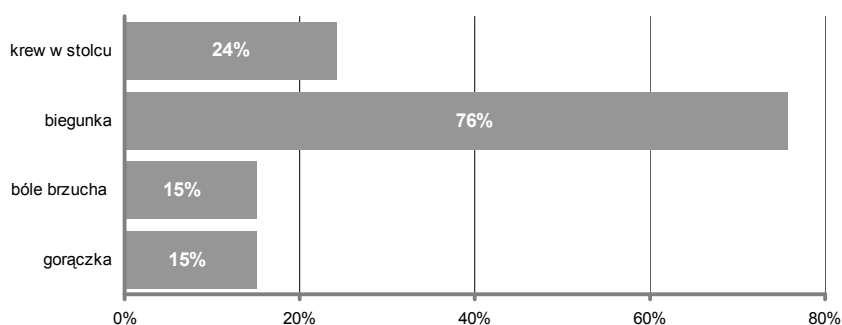
**Tab. 8. Objawy kliniczne u chorych w grupie I i grupie II**  
**Tab. 8. Clinical symptoms in patients from groups I and II**

Objaw <i>Symptom</i>	Grupa I <i>Group I</i> (N=33)				Grupa II <i>Group II</i> (N=9)			
	Nie <i>No</i>		Tak <i>Yes</i>		Nie <i>No</i>		Tak <i>Yes</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	8	24,24	25	75,76	9	100,00	0	0,00
Krew w stolcach <i>Bloody stool</i>	25	75,76	8	24,24	0	0,00	9	100,00
Bóle brzucha <i>Abdominal pain</i>	28	84,85	5	15,15	8	88,89	1	11,11
Gorączka <i>Fever</i>	28	84,85	5	15,15	7	77,78	2	22,22

Objawy biegunki znacząco dominowały w grupie chorych (N=33) i występowała ona u 3/4 badanej grupy, (dokładny test Fishera;  $p < 0,001$ ). U 1/4 chorych stwierdzano krew w stolcach (24,24%). Natomiast takie objawy jak bóle brzucha i gorączka stwierdzano jedynie w 15,15%.

U wszystkich pacjentów z grupy porównawczej (N=9) objawem wiążącym była obecność krwi w stolcach, z tego też powodu skierowani byli do diagnostyki. W wykonanej kolonoskopii zmiany endoskopowe określano jako lekkie, a w badaniu histologicznym bioptatów zmian patologicznych typowych dla IBD nie stwierdzono.

Dalsza diagnostyka pozwoliła stwierdzić, że przyczyną obecności krwi w stolcach były u 2 chorych zmiany okołodbytnicze (szczelina odbytu, guzki/guzek krwawniczy odbytu), u kolejnych 2 pacjentów prawdopodobnie polip odbytnicy – ze wskazaniem na miejsce po samoistnej amputacji polipa, u kolejnych naczynek odbytnicy, owsica. U 3 dzieci nie znaleziono przyczyny, która tłumaczyłyby incydentalną obecność krwi w stolcach. Bóle brzucha i gorączka nie były objawem dominującym i występowały u 15,15% badanych w obu grupach.



**Ryc. 3. Występowanie analizowanych objawów klinicznych u osób chorych w grupie I w%**

**Fig. 3. The incidence of clinical symptoms in patients from group I [in%].**

**Tab. 9. Częstość występowania postaci UC w grupie I**

**Tab. 9. The frequency of particular forms of ulcerative colitis occurrence in group I.**

Postać choroby <i>Disease feature</i>	Liczba chorych z grupy I <i>Number of patients from group I</i>	%
Łagodna <i>Mild</i>	16	48,48
Umiarkowana <i>Moderate</i>	15	45,45
Ciężka <i>Severe</i>	2	6,06
Ogółem <i>Total</i>	33	100,00

W grupie badanych chorych dominowali pacjenci z łagodną i umiarkowaną postacią choroby (93,9%), natomiast tylko u 2 chorych aktywność schorzenia oceniono jako ciężką postać UC

**Tab. 10. Odsetek pacjentów z odchyleniami w wynikach badań laboratoryjnych w grupie I**

**Tab. 10. The percent of patients with abnormal laboratory results in group I**

Badania laboratoryjne <i>Laboratory findings</i>	Liczba osób z odchyleniami w badaniu <i>Number of patients with abnormal laboratory findings</i>	%	Normy <i>Normal range</i>
OB ↑ SR ↑	23	69,7%	4-11 mm/godz.
CRP ↑	18	54,5%	0,0-5,5 mg/l
Leukocytoza ↑ <i>Leucocytosis</i> ↑	14	42,4%	4,50-13,00 k/ul
Rozmaz ↑ (ze wzrostem granulocytów obojętnochłonnych) <i>Leucocyte smear</i>	12	36,4%	neutrocyty <i>neutrophiles</i> : 39,0-75,0% eozynofile <i>eosynophiles</i> : 1,5-4,5% bazofile <i>basophiles</i> : 0,1-0,6% limfocyty <i>lymphocytes</i> : 18,0-52,0% monocyty <i>monocytes</i> : 2,5-7,5%
Hemoglobina ↓ <i>Hemoglobin</i> ↓	13	39,4%	12,0-16,0 g/dl
Płytki ↑ <i>Platelets</i> ↑	19	57,6%	150-400 k/ul
Fibrynogen ↑ <i>Fibrinogen</i> ↑	14	42,4%	1,80-4,60 g/l
Albuminy g/dl ↓ <i>Albumin</i> ↓	4	12,1%	35-50 g/dl

U chorych w grupie I (N=33) odchylenia od normy w badaniach laboratoryjnych stwierdzono głównie w zakresie OB (69,7%), płytek krwi (57,6%), CRP (54,5%). Występowały one u ponad połowy badanych. Pozostałe badania, takie jak poziom leukocytozy z przesunięciem w lewo, poziom hemoglobiny, poziom fibrynogenu, wykazały nieprawidłowe wartości u badanych w granicach pomiędzy 36,4% a 42,4%.

**Tab. 11. Wskaźnik Cole'a u osób chorych w grupie I**  
**Tab. 11. Cole's coefficient in patients from group I**

Wskaźnik Cole'a <i>Cole index</i>	Liczba pacjentów <i>Number of patients</i>	Skumulowana liczba pacjentów <i>Cumulative number of patients</i>	%	Skumulowany% <i>Cumulative %</i>
75-85	1	1	3,03	3,0
85-90	21	22	63,64	66,7
90-110	10	32	30,30	97,0
>110	1	33	3,03	100,0

Stan odżywienia dzieci badanych z grupy I określano wskaźnikiem Cole'a. Wartości wskaźnika Cole'a wyrażone w procentach wahały się głównie pomiędzy 85-90 a 90-110 i świadczyły o prawidłowym odżywieniu lub umiarkowanym niedożywieniu pacjenta. W tym przedziale mieści się 97% badanych.

**Tab. 12. Stosowane leczenie (z wywiadu i aktualnie) u chorych z grupy I (N=33)**

**Tab. 12. The treatment used (previously and at the time of study) in patients from group I (N=33)**

Stosowane leczenie <i>Treatment</i>	N	%
5-ASA w wywiadzie <i>5-ASA in anamnesis</i>	22	66,6
5-ASA aktualnie <i>actually 5-ASA</i>	12	36,36
Sterydoterapia w wywiadzie <i>steroids in anamnesis</i>	16	48,48
Sterydoterapia aktualnie <i>steroids actually</i>	6	18,18
Azathiopryna w wywiadzie <i>azathioprin in anamnesis</i>	10	30,30
Azathiopryna aktualnie <i>azathioprin actually</i>	9	27,27
Antybiotykoterapia w wywiadzie <i>antibiotics in anamnesis</i>	15	45,45
Antybiotykoterapia aktualnie <i>antibiotics actually</i>	6	18,18
Metronidazol w wywiadzie <i>metronidazole in anamnesis</i>	4	12,12
Metronidazol aktualnie <i>metronidazole actually</i>	10	30,30
Probiotyk w wywiadzie <i>probiotic in anamnesis</i>	7	21,21
Probiotyk aktualnie <i>probiotic actually</i>	21	63,64

Pacjenci z grupy I przed włączeniem do badań byli leczeni średnio 6,6 miesiąca (w przedziale od 1 do 19 miesięcy). W przedziale leczenia od 1-

3 miesiące chorzy otrzymywali głównie 5-ASA, w przedziale od 5-7 miesięcy stosowana była ponadto sterydoterapia, leczenie immunosupresyjne stosowano średnio powyżej 7 miesięcy trwania choroby. W tym dłuższym okresie leczenia stosowano zazwyczaj również poprzednie leki.

W trakcie określanych w pracy parametrów większość chorych otrzymywała probiotyki (63,64%), 5-ASA (36,36%), metronidazol (30,30%), immunosupresję (27,27%), sterydoterapię (18,18%), antybiotykoterapię (18,18%).

**Tab. 13. Wskaźnik zmian endoskopowych wg Rachmilewita w obu grupach**  
**Tab. 13. The index of endoscopic changes after Rachmilewitz in both groups**

Aktywność zmian endoskopowych <i>Endoscopic changes activity</i>	Grupa I <i>Group I</i>	%	Grupa II <i>Group II</i>	%
Lekka <i>Mild</i>	10	30,30	9	100
Umiarkowana <i>Moderate</i>	12	36,36	0	0
Znaczna <i>Significant</i>	11	33,33	0	0
Ogółem <i>Total</i>	33		9	

Aktywność zmian endoskopowych kwalifikowano opierając się na wskaźniku zmian endoskopowych (EI) wg Rachmilewita, (Tab. 2) w którym punktowano: granulację bł. śluzowej, rysunek naczyniowy, ranliwość bł. śluzowej i powierzchnię bł. śluzowej (śluz, ropa, owrzodzenia, nadżerki) i wg. skali punktowej określono zmiany jako lekkie nasilenie, umiarkowane i znaczne nasilenie zmian.

U pacjentów z grupy badanej aktywność zmian endoskopowych w poszczególnych stopniach była podobna i wynosiła w stopniu aktywności lekkiej 30,30%, umiarkowanej 36,36%, a w znacznym stopniu aktywności 33,33%. W grupie porównawczej II zmiany w koloskopii były minimalne, z niewielką granulacją i wzmożoną krwawliwością. Zmiany w obrazie endoskopowym zakwalifikowano jako lekkie, następnie poddawane zostały weryfikacji histopatologicznej.

**Tab. 14. Zaawansowanie zmian w badaniu histopatologicznym wycinków jelita w grupach I i II według wskaźnika aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (Maier i wsp.)**

*Tab. 14. The intensity of changes in histological examination of colon samples in groups I and II according to ulcerative colitis activity index (Maier and al.)*

Zaawansowanie zmian histologicznych <i>Progression of histological changes</i>	Grupa I <i>Group I</i>	%	Grupa II <i>Group II</i>	%	Ogółem <i>Total</i>
0 stopień <i>degree</i>	0	0,00	9	100,00	9
1 stopień <i>degree</i>	9	27,27	0	0,00	9
2 stopień <i>degree</i>	7	21,21	0	0,00	7
3 stopień <i>degree</i>	8	24,24	0	0,00	8
4 stopień <i>degree</i>	9	27,27	0	0,00	9
Ogółem <i>Total</i>	33	100,00	9	100,00	42

Stopień zaawansowania zmian w obrazie histopatologicznym wskazuje, że średnio w każdym stopniu, począwszy od niewielkich, aż do zaawansowanych zmian, mieści się ¼ chorych. 4 stopień wykazują pacjenci u których 7 z nich miało w przyszłości wykonaną kolektomię. W grupie porównawczej nie stwierdzano zmian zapalnych w obrazie mikroskopowym jelita.

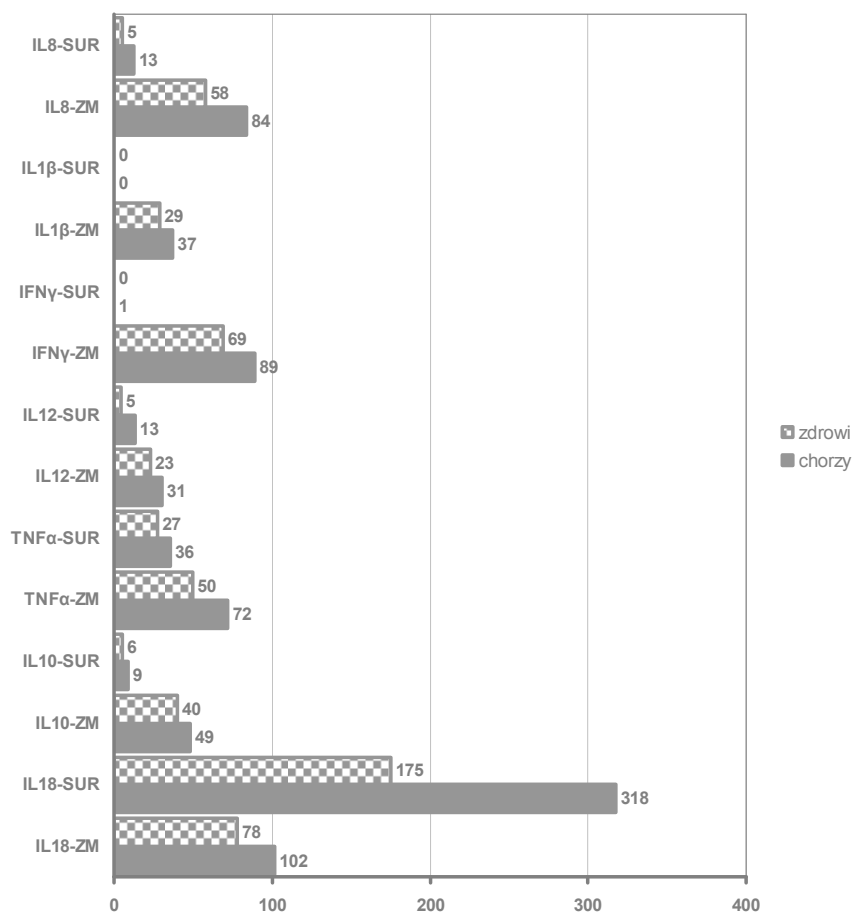
## II część wyników

Ocena poziomu cytokin prozapalnych: interferonu gamma (INF $\gamma$ ), interleukiny 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleukiny 8 (IL-8) i czynnika martwicy nowotworów (TNF $\alpha$ ), cytokiny przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10) oraz cytokin immunostymulacyjnych: interleukiny 12 (IL-12) i interleukiny 18 (IL-18) w ścianie jelita grubego (ZM) oraz w surowicy krwi (SUR) dzieci chorych na UC

**Tab. 15. Stężenie cytokin w surowicy krwi (SUR) pg/ml oraz poziom ekspresji genów cytokin w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) w badanych grupach I i II**

**Tab. 15. The concentration of cytokines in plasma and expression of cytokines' genes in colon mucosa samples of studied groups I and II**

Cytokina Cytokin	Średnia Mean		N		SD		Test U	p-level
	Gr. I	Gr. II	Gr. I	Gr. II	Gr. I	Gr. II		
IL-18-ZM	101,79	77,73	33	9	8,86	8,09	8,0	0,001*
IL-18-SUR	317,53	175,34	33	9	89,43	43,51	2,0	0,001*
IL-10-ZM	48,59	39,91	33	9	15,68	18,76	99,0	0,129
IL-10-SUR	8,84	5,56	33	9	5,03	6,61	103,0	0,163
TNF $\alpha$ -ZM	72,17	49,73	33	9	16,62	17,89	52,0	0,003*
TNF $\alpha$ -SUR	35,85	27,17	33	9	17,94	15,87	107,5	0,209
IL-12-ZM	30,54	23,30	33	9	10,23	6,38	86,0	0,055
IL-12-SUR	13,41	4,70	33	9	13,14	1,50	56,0	0,005*
IFN $\gamma$ -ZM	89,21	69,11	33	9	16,75	19,54	62,0	0,008*
IFN $\gamma$ -SUR	0,60	0,45	33	9	0,25	0,24	97,5	0,118
IL-1 $\beta$ -ZM	37,21	28,76	33	9	17,50	15,39	107,0	0,203
IL-1 $\beta$ -SUR	0,00	0,00	33	9	0,00	0,00	148,5	1,000
IL-8-ZM	83,50	58,17	33	9	13,65	8,00	27,0	0,001*
IL-8-SUR	12,58	5,49	33	9	11,06	5,06	80,5	0,037*

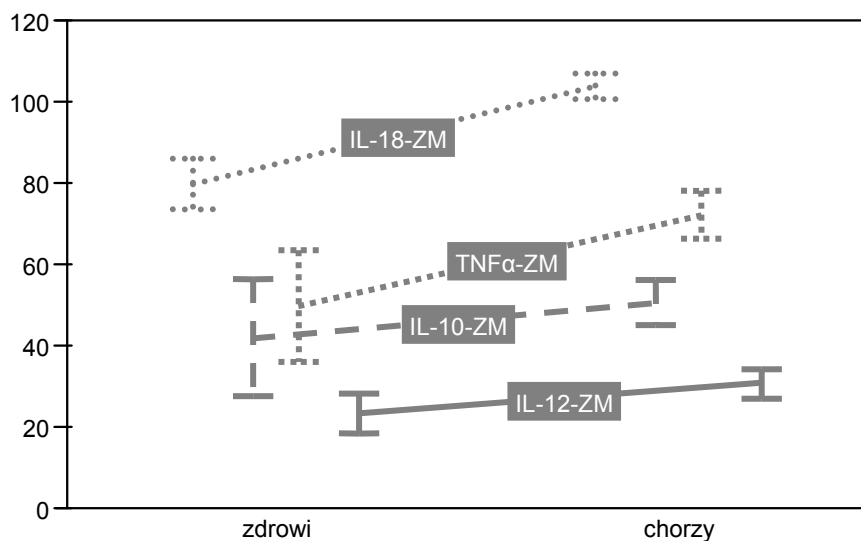


**Ryc. 4. Stężenie cytokin w surowicy krwi (SUR) pg/ml, oraz poziom ekspresji genów cytokin w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) w badanych grupach I i II**

**Fig. 4. The cytokines' concentration in plasma (SUR) and cytokine genes' expression in colon mucosa samples (ZM) in studied groups I and II**

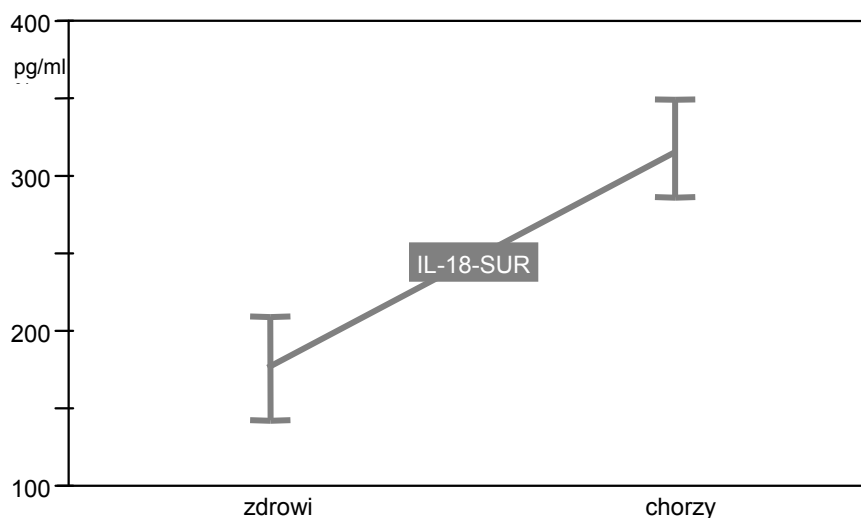
Poziom IL-10 w surowicy i IL-1β tak we krwi jak i oceniane w zmienionej śluzówce jelita grubego (ZM) nie są znamienne statystycznie w porównaniu między grupą I (chorymi) a grupą II (porównawczą). Wszystkie pozostałe wartości cytokin są różne, a znamienne statystycznie w obu grupach przedstawiono graficznie w poniższej zamieszczonych rysunkach





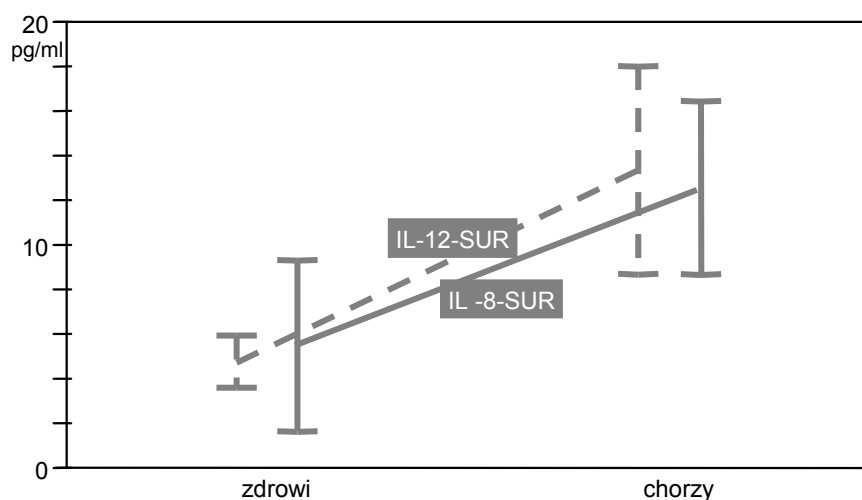
**Ryc. 5. Poziom ekspresji genów cytokin IL-18, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) w badanych grupach I i II**  
**Fig. 5. The expression of IL-18, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  genes in colon mucosa samples (ZM) in studied groups I and II**

Ekspresje genów IL-18, TNF $\alpha$ , a w mniejszym stopniu, ale znamienym statystycznie IL-10 i IL-12 wykazują wyższe poziomy w wycinkach błony śluzowej w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną.



**Ryc. 6. Stężenie IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml w badanych grupach I i II**  
**Fig. 6. The concentration of IL-18 in plasma (SUR) in groups I and II**

IL-18 (interleukina immunostymulacyjna) w surowicy wykazuje znacznie statystycznie wyższe wartości u chorych z UC niż w grupie porównawczej



Ryc. 7. Stężenie IL-8 i IL-12 w surowicy krwi (SUR) pg/ml w badanych grupach I i II

*Fig. 7. The concentration of IL-8 and IL-12 in plasma (SUR) in groups I and II*

Stężenie IL-8 (cytokiny prozapalnej) i IL-12 (interleukiny immunostymulacyjnej) w surowicy krwi wykazuje znacznie statystycznie różnice pomiędzy grupami. Obie cytokiny wykazują w grupie chorych na UC wartości wyższe w porównaniu z pacjentami z grupy porównawczej.

**Tab. 16. Zależność stężenia cytokin w surowicy krwi (SUR) pg/ml oraz poziom ekspresji genów cytokin w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 16. The concentration of cytokines in plasma and expression of cytokines' genes in colon mucosa samples of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	Średnia Mean			
	1 m	2 m	3 m	≥ 4 m
IL-18-ZM	100,6	102,2	99,1	105,2
IL-18-SUR	301,6	300,4	360,7	344,2
IL-10-ZM	43,5	53,3	48,2	53,6
IL-10-SUR	6,9	9,5	7,8	12,5
TNF $\alpha$ -ZM	75,0	67,5	72,1	71,8
TNF $\alpha$ -SUR	30,7	35,5	45,0	41,4
IL-12-ZM	29,4	30,6	33,9	30,8
IL-12-SUR	9,0	15,2	22,9	14,7
IFN $\gamma$ -ZM	85,3	92,7	85,9	94,9
IFN $\gamma$ -SUR	0,6	0,6	0,5	0,7
IL-1 $\beta$ -ZM	34,8	39,7	40,1	37,4
IL-1 $\beta$ -SUR	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-8-ZM	82,6	90,3	68,9	85,8
IL-8-SUR	13,3	13,6	7,0	13,2

Nie stwierdzono zależności czasu trwania choroby i średniego poziomu cytokin.

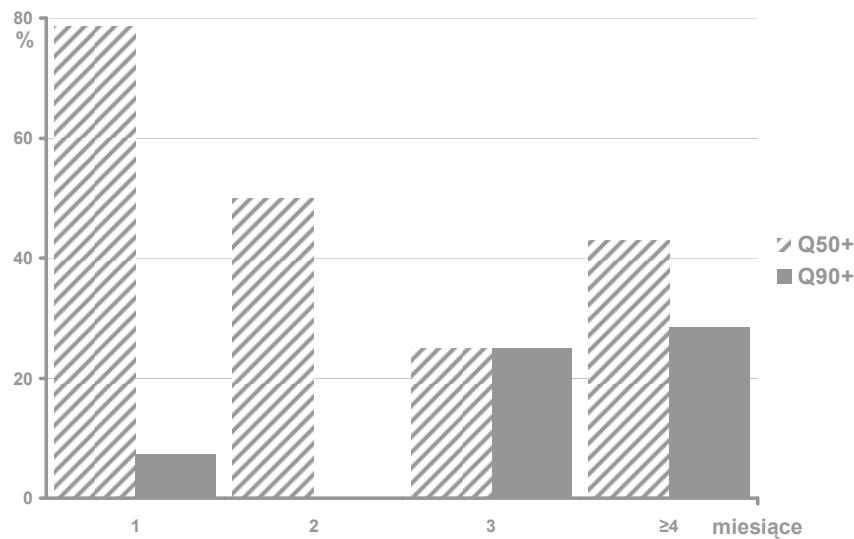
Przeprowadzono szczegółową analizę statystyczną stosując częstości przekroczeń granicznych kwantyli. Analizie poddano czas trwania choroby i częstość występowania wysokich lub niskich poziomów cytokin. W przypadku kwantyli rzędu 10% i 90% przynależność do grupy Q10- i Q90+ symbolicznie nazywamy przekroczeniem patologicznym.

**Tab. 17. Zależność stężenia cytokiny IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 17. IL-18 concentration in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	IL-18-SUR				Ogółem <i>Total</i>
	Q90-	%	Q90+	%	
1 m	13	92,86	1	7,14	14
2 m	8	100,00	0	0,00	8
3 m	3	75,00	1	25,00	4
≥ 4 m	5	71,43	2	28,57	7
Ogółem <i>Total</i>	29		4		33

**Tab. 18. Zależność stężenia cytokiny IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 18. IL-18 concentration in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	IL-18-SUR				Ogółem <i>Total</i>
	mediana-	%	mediana+	%	
1 m	3	21,43	11	78,57	14
2 m	4	50,00	4	50,00	8
3 m	3	75,00	1	25,00	4
≥ 4 m	4	57,14	3	42,86	7
Ogółem <i>Total</i>	14		19		33



**Ryc. 8. Zależność stężenia cytokiny IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych od czasu trwania choroby (w% pacjentów powyżej zaznaczonego kwantyla IL-18)**

**Fig. 8. The concentration of IL-18 in plasma (SUR) of patients depending on the disease duration (in% of patients over the marked IL-18 quantil)**

Można potwierdzić, w sposób statystycznie istotny wniosek, że osoby o dłuższym czasie trwania choroby (3 lub 4 miesiące) często mają bardzo podwyższony poziom IL-18 w surowicy krwi (SUR) (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=11$ ;  $p<0,015$ ).

**Tab. 19. Zależność stężenia cytokiny IL-10 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**

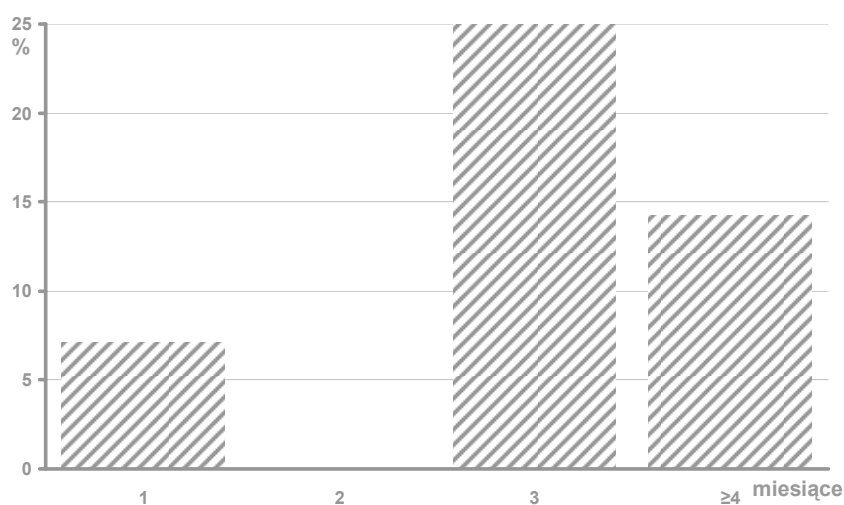
**Tab. 19. IL-10 concentration in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) Disease duration time in months	IL-10-SUR				Ogółem Total
	Q10-	%	Q10+	%	
1 m	3	21,43	11	78,57	14
2 m	0	0,00	8	100,00	8
3 m	0	0,00	4	100,00	4
≥ 4 m	0	0,00	7	100,00	7
Ogółem Total	3		30		33

W sposób statystycznie istotny poziom w surowicy krwi IL-10 (SUR) jest obniżony u pacjentów, którzy chorują krótko (1 miesiąc) (Exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=14$ ;  $p<0,030$ )

**Tab. 20. Zależność stężenia cytokiny TNF $\alpha$  w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 20. IL-10 concentration in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	TNF $\alpha$ -SUR				Ogółem <i>Total</i>
	Q90-	%	Q90+	%	
1 m	13	92,86	1	7,14	14
2 m	8	100,00	0	0,00	8
3 m	3	75,00	1	25,00	4
$\geq 4$ m	6	85,71	1	14,29	7
Ogółem <i>Total</i>	30		3		33



**Ryc. 9. Zależność stężenia cytokiny TNF $\alpha$  w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby (w% pacjentów powyżej 90% kwantyla TNF $\alpha$ )**

**Fig. 9. The concentration of TNF $\alpha$  in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration (in% of patients over the 90% TNF $\alpha$  quantil)**

Można potwierdzić, w sposób statystycznie istotny wniosek, że osoby o dłuższym czasie trwania choroby (3 lub 4 miesiące) mają często znacznie podwyższony poziom TNF $\alpha$  w surowicy krwi (exact test 5%; N $\alpha$ =2; N=11; p<0, 015)

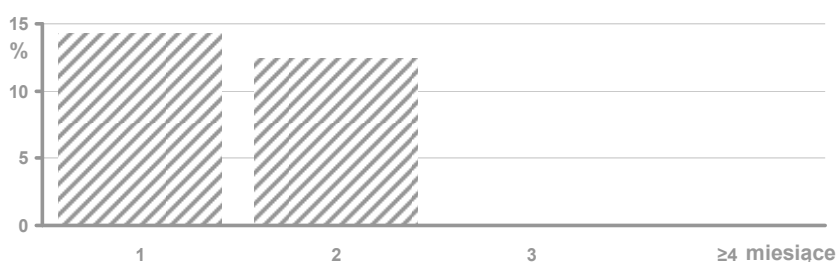
**Tab. 21. Zależność poziomu ekspresji genu IL-12 w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 21. The expression of IL-12 gene in colon mucosa samples (ZM) in patients depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	IL-12-ZM				Ogółem <i>Total</i>
	Q90-	%	Q90+	%	
1 m	12	85,71	2	14,29	14
2 m	7	87,50	1	12,50	8
3 m	4	100,00	0	0,00	4
≥ 4 m	7	100,00	0	0,00	7
Ogółem <i>Total</i>	30		3		33

Można potwierdzić, w sposób statystycznie istotny wniossek, że osoby o krótkim czasie trwania choroby (1 lub 2 miesiące) mają podwyższony poziom ekspresji genu IL-12 (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=14$ ;  $p<0,030$ )

**Tab. 22. Zależność stężenia cytokiny IL-12 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**  
**Tab. 22. IL-12 concentration in plasma (SUR) of patients from group I depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	IL-12-SUR				Ogółem <i>Total</i>
	Q10-	%	Q10+	%	
1 m	2	14,29	12	85,71	14
2 m	1	12,50	7	87,50	8
3 m	0	0,00	4	100,00	4
≥ 4 m	0	0,00	7	100,00	7
Ogółem <i>Total</i>	3		30		33



**Ryc. 10. Zależność stężenia cytokiny IL-12 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I (N=33) od czasu trwania choroby (w% pacjentów poniżej 10% kwantyla IL-12)**

**Fig. 10. The concentration of IL-12 in plasma (SUR) of patients from group I (N=33) depending on the disease duration [in% of patients over the 10% IL-12 quantil]**

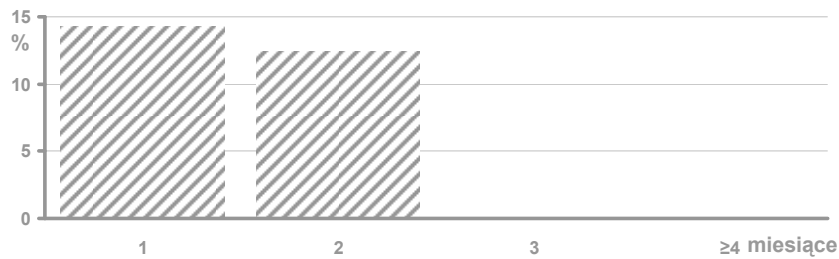
W sposób statystycznie istotny, zauważalne jest patologiczne obniżenie IL-12 w surowicy krwi (odwrotnie niż ma to miejsce w zmienionej śluzówce jelita, czyli odpowiedzi miejscowej) dla 1 i 2 miesięcy czasu trwania choroby (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=14$ ;  $p<0,030$ ).

**Tab. 23. Zależność ekspresji genu IFN  $\gamma$  w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**

**Tab. 23. The expression of IFN  $\gamma$  gene in colon mucosa samples (ZM) of patients from group I, depending on the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące – m) Disease duration time in months	IFN $\gamma$ -ZM				Ogółem Total
	Q10-	%	Q10+	%	
1 m	2	14,29	12	85,71	14
2 m	1	12,50	7	87,50	8
3 m	0	0,00	4	100,00	4
≥ 4 m	0	0,00	7	100,00	7
Ogółem Total	3		30		33





**Ryc. 11. Zależność poziomu ekspresji genu IFN $\gamma$  w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (ZM) u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby (w% pacjentów poniżej 10% kwantyla IFN $\gamma$ )**

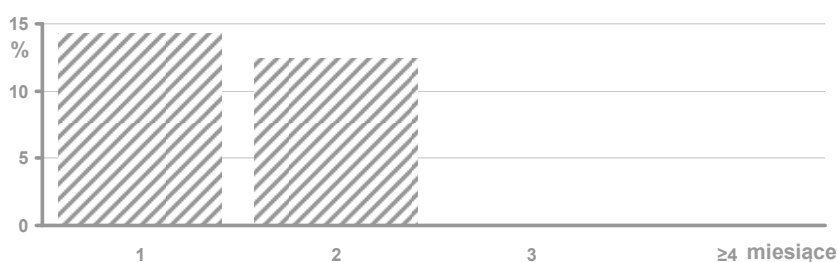
**Fig. 11. The IFN  $\gamma$  gene expression in colon mucosa samples (ZM) in patients from group I depending on the disease duration (in% of patients under the 10% IFN  $\gamma$  quantil)**

Możemy potwierdzić, w sposób statystycznie istotny wniosek, że osoby o krótkim czasie trwania choroby (1 lub 2 miesiące) mają patologicznie podwyższonego poziom ekspresji genu IFN $\gamma$  (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=14$ ;  $p<0,030$ )

**Tab. 24. Zależność czasu trwania choroby i stężenia IL-8 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I**

**Tab. 24. The dependence between the disease duration and IL-8 concentration in plasma (SUR) of patients from group I**

Czas trwania choroby (miesiące – m) <i>Disease duration time in months</i>	IL-8-SUR				Ogółem <i>Total</i>
	Q90-	%	Q90+	%	
1 m	12	85,71	2	14,29	14
2 m	7	87,50	1	12,50	8
3 m	4	100,00	0	0,00	4
≥ 4 m	7	100,00	0	0,00	7
Ogółem <i>Total</i>	30		3		33



**Ryc. 12. Zależność czasu trwania choroby i stężenia IL-8 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u osób chorych z grupy I (w% pacjentów powyżej 90% kwantyla IL-8)**  
**Fig. 12. The dependence between the disease duration and the IL-18 plasma (SUR) concentration in patients from group I (in% of patients over the 90% IL-8 quantil)**

W sposób statystycznie istotny, zauważalny jest wyższy poziom IL-8 w surowicy krwi w krótkim okresie trwania choroby (dla 1 miesiąca) (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=14$ ;  $p<0,030$ )

Analizie statystycznej poddano zależność poziomu cytokin i aktywności choroby u osób chorych z grupy I

**Tab. 25. Zależność poziomu ekspresji genu IL-18 (ZM) i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 25. The dependence between the expression level of IL-18 gene (ZM) and UC activity of patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-18-ZM							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	100,8	16	7,918	82,0	110,4	97,0	102,8	105,9
Umiarkowana <i>Moderate</i>	102,4	15	10,418	83,4	126,5	96,2	105,4	106,1
Ciężka <i>Severe</i>	105,6	2	0,714	105,1	106,1	105,1	105,6	106,1
Ogółem <i>Total</i>	101,8	33	8,859	82,0	126,5			

IL-18 w śluzówce jelita dzieci chorych (ZM) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 26. Zależność stężenia cytokiny IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 26. The dependence between the IL-8 concentration in plasma (SUR) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-18-SUR							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	324,9	16	91,459	239,4	563,3	260,0	317,5	342,7
Umiarkowana <i>Moderate</i>	312,5	15	95,541	209,3	563,3	245,8	275,9	323,0
Ciężka <i>Severe</i>	296,1	2	22,578	280,1	312,1	280,1	296,1	312,1
Ogółem <i>Total</i>	317,5	33	89,435	209,3	563,3			

IL-18 w surowicy dzieci chorych (SUR) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 27. Zależność poziomu ekspresji genu IL-10 (ZM) i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 27. The dependence between the expression level of IL-10 gene (ZM) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-10-ZM							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	47,7	16	15,604	28,8	79,0	35,1	42,8	61,1
Umiarkowana <i>Moderate</i>	49,8	15	16,466	31,4	77,5	35,8	41,4	68,0
Ciężka <i>Severe</i>	46,5	2	19,460	32,7	60,2	32,7	46,5	60,2
Ogółem <i>Total</i>	48,6	33	15,680	28,8	79,0			

IL-10 w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych (ZM) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 28. Zależność stężenia cytokiny IL-10 w surowicy krwi (SUR) pg/ml i aktywności UC u osób chorych z grupy I**  
**Tab. 28. The dependence between the IL-10 concentration in plasma (SUR) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-10-SUR							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	8,6	16	5,123	0,0	17,1	7,2	8,6	13,3
Umiarkowana <i>Moderate</i>	9,6	15	4,853	0,1	18,6	8,2	10,0	13,3
Ciężka <i>Severe</i>	4,8	2	6,518	0,2	9,4	0,2	4,8	9,4
Ogółem <i>Total</i>	8,8	33	5,028	0,0	18,6			

IL-10 w surowicy dzieci chorych (SUR) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 29. Zależność poziomu ekspresji genu IL-12 (ZM) i aktywności UC u osób chorych z grupy I**  
**Tab. 29. The dependence between the expression level of IL-12 gene (ZM) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-12-ZM							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	30,8	16	10,970	17,0	52,7	23,5	27,7	39,0
Umiarkowana <i>Moderate</i>	29,2	15	8,674	17,0	52,7	21,0	29,1	31,2
Ciężka <i>Severe</i>	38,9	2	17,883	26,3	51,6	26,3	38,9	51,6
Ogółem <i>Total</i>	30,5	33	10,227	17,0	52,7			

IL-12 w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych (ZM) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 30. Zależność stężenia cytokiny IL-12 w surowicy krwi (SUR) pg/ml i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 30. The dependence between the IL-12 concentration in plasma (SUR) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-12-SUR							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	15,4	16	14,376	3,8	41,2	5,2	7,0	24,8
Umiarkowana <i>Moderate</i>	12,4	15	12,556	3,8	41,2	4,7	6,7	13,3
Ciężka <i>Severe</i>	5,2	2	2,022	3,8	6,6	3,8	5,2	6,6
Ogółem <i>Total</i>	13,4	33	13,143	3,8	41,2			

IL-12 w surowicy krwi u dzieci chorych (SUR) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 31. Zależność poziomu ekspresji genu IL-1 $\beta$  (ZM) i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 31. The dependence between the expression level of IL-1 $\beta$  gene (ZM) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-1 $\beta$ -ZM							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	39,8	16	20,466	8,0	86,8	25,5	41,6	52,2
Umiarkowana <i>Moderate</i>	35,1	15	14,928	11,8	54,1	23,0	35,8	49,4
Ciężka <i>Severe</i>	32,6	2	13,513	23,0	42,1	23,0	32,6	42,1
Ogółem <i>Total</i>	37,2	33	17,504	8,0	86,8			

IL-1  $\beta$  w zmienionej śluzowce jelita dzieci chorych (ZM) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 32. Zależność poziomu ekspresji genu IL-8 (ZM) i aktywności UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 32. The dependence between the expression level of IL-8 gene (ZM) and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-8-ZM							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	82,4	16	14,300	59,5	97,8	66,5	88,7	94,2
Umiarkowana <i>Moderate</i>	83,8	15	14,031	64,3	99,9	65,9	89,3	97,5
Ciężka <i>Severe</i>	90,3	2	5,325	86,5	94,1	86,5	90,3	94,1
Ogółem <i>Total</i>	83,5	33	13,653	59,5	99,9			

IL-8 w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych (ZM) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

**Tab. 33. Zależność stężenia cytokiny IL-8 w surowicy krwi (SUR) pg/ml i aktywności UC u osób chorych z grupy I (N=33)**

**Tab. 33. The dependence between the IL-8 concentration in plasma (SUR) and UC activity in patients from group**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	IL-8-SUR							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Łagodna <i>Mild</i>	10,3	16	5,908	0,1	19,2	6,1	10,3	14,3
Umiarkowana <i>Moderate</i>	12,7	15	8,080	0,1	31,4	8,9	12,1	19,2
Ciężka <i>Severe</i>	30,0	2	42,228	0,1	59,9	0,1	30,0	59,9
Ogółem <i>Total</i>	12,6	33	11,056	0,1	59,9			

IL-8 w surowicy dzieci chorych (SUR) ma ten sam poziom w różnych stopniach aktywności choroby i jest on statystycznie nieznamienny.

Przeprowadzając analizę poziomu cytokin tak w surowicy jak i w śluzówce jelita w zależności od wyników hodowli beztlenowej bioptatów u dzieci chorych na UC nie otrzymujemy zadawalających rezultatów.

Wartości średnie wszystkich cytokin u pacjentów, u których w hodowli beztlenowej wycinków nie stwierdzono bakterii, lub hodowla wykazała obecność szczepów tak SRB- jak i SRB+, są porównywalne i nieznamienne statystycznie.

Natomiast bardziej szczegółowa analiza pozwala na subtelny wniosek tylko w odniesieniu do IL-10-ZM (w zmienionej śluzówce jelita – ZM) co odzwierciedla poniższa tabela.

**Tab. 34. Analiza poziomu ekspresji genu IL-10 w zależności od wyników hodowli beztlenowej w wycinkach u chorych z grupy I**

*Tab. 34. The analysis of IL-10 gene's expression depending on the anaerobic culture results in samples of patients from group I*

Rodzaj szczepu <i>Type of strain</i>	IL-10-ZM	%	IL-10-ZM	%	Ogółem <i>Total</i>
	Q90-		Q90+		
SRB-	13	81,25	3	18,75	16
SRB+	15	100,00	0	0,00	15
Ogółem <i>Total</i>	28		3		31

Podwyższenie (powyżej Q90) ekspresji genu IL-10 obserwujemy częściej u pacjentów, u których w hodowli beztlenowej nie stwierdzono bakterii redukujących siarkę (SRB-) (exact test 5%;  $N\alpha=3$ ;  $N=16$ ;  $p<0,007$ )

### III część wyników

Ocena składu flory jelitowej dzieci chorych na UC ze szczególnym uwzględnieniem obecności szczepów beztlenowych

**Tab. 35. Zestawienie wyników hodowli bakteryjnych (przeprowadzonych w warunkach beztlenowych, z oceną zdolności syntezy siarkowodoru), z bioptatów błony śluzowej jelita grubego w badanych grupach I i II**

*Tab. 35. The anaerobic culture of sulphate-reducing bacteria (SRB+) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) in colon mucosa samples in group I and II*

Wynik badania mikrobiologicznego <i>Microbiological research</i>	Ujemny <i>Negative</i> (N=11)	Szczepy Bakterii <i>Bacterial Strain</i> SRB- (N=16)	Szczepy Bakterii <i>Bacterial Strain</i> SRB+ (N=15)
Grupa I Group I (N=33)	2 (6,06%)	16 (48,48%)	15 (45,45%)
Grupa II Group II (N=9)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

W grupie I u 2 chorych (6,1%) nie wyhodowano żadnych bakterii beztlenowych, a u 31 chorych (93,9%) uzyskano dodatni wynik hodowli mikrobiologicznych wycinków błony śluzowej kątnicy. Wśród tych pacjentów, u 15 osób (48,4%) wyhodowane bakterie posiadały zdolność do syntetyzowania siarkowodoru. W większości przypadków wyhodowane bakterie należały do rodzaju *Bacteroides* i *Clostridium*. W grupie II we wszystkich przypadkach wynik hodowli bioptatów był ujemny.

**Tab. 36. Zależność aktywności UC w grupie I od występowania bakterii SRB- i SRB+ w hodowli wycinków śluzówki jelita grubego**

**Tab. 36. The activity of UC in group I (N=33) depending on the presence of SRB- and SRB+ in colon mucosa samples cultures**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	Wynik hodowli beztlenowej <i>Anaerobic culture</i>						
	Ujemny <i>Negative</i>	%	SRB-	%	SRB+	%	Ogółem <i>Total</i>
Łagodna <i>Mild</i>	1	6,25	10	62,50	5	31,25	16
Umiarkowana <i>Moderate</i>	1	6,67	6	40,00	8	53,33	15
Ciężka <i>Severe</i>	0	0,00	0	0,00	2	100,00	2
Ogółem <i>Total</i>	2		16		15		33

Oceniając zależności pomiędzy wynikami hodowli beztlenowej wycinków a aktywnością choroby nie stwierdza się znamiennych różnic u chorych z różnymi postaciami aktywności choroby. Można jednak zauważyć, że w przypadkach dodatniej hodowli, w której stwierdzono bakterie redukujące siarkę (SRB+), dominowali chorzy z umiarkowaną i ciężką postacią choroby, przy hodowli bakterii nie redukujących siarkę (SRB-) było więcej chorych z postacią łagodną i umiarkowaną. Nie były jednak to wartości znamienne statystycznie.

#### IV część wyników

Ocena ilości włókien nerwowych zaopatrujących warstwę błony śluzowej w wycinkach śluzówki jelita grubego u pacjentów z UC w różnych stadiach i stopniu zaawansowania schorzenia z uwzględnieniem stosowanej terapii

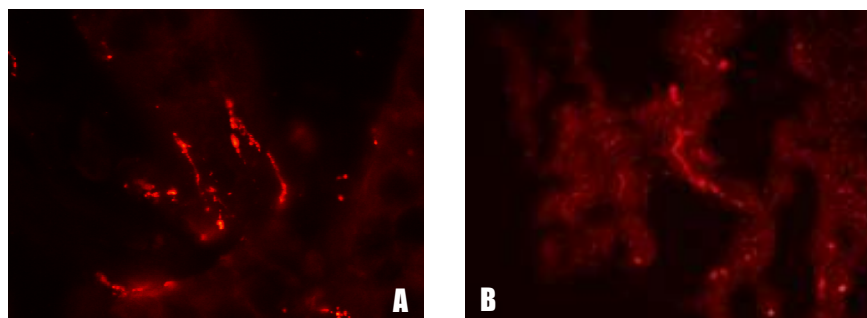
**Tab. 37. Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR w badanych grupach: I – dzieci chorych na UC i II – porównawczej**

**Tab. 37. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres in studied groups I and II**

PACAP-IR	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Grupa I <i>Group I</i>	7,1	33	4,06	2,2	21,3	4,0	6,2	9,0
Grupa II <i>Group II</i>	15,7	9	9,95	3,4	28,0	4,9	20,4	22,6
Ogółem <i>Total</i>	8,9	42	6,71	2,2	28,0			

Zachodzi różnica w liczebności włókien PACAP-IR w obu grupach. W grupie porównawczej (N=9) jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie chorych (test U; U=81,5; p<0,040)





Ryc. 13. Obraz włókien PACAP-IR w śluzówce jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba terminali PACAP-IR w śluzówce jelita w porównaniu z liczbą włókien u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 13. Distribution pattern of PACAP-IR nerve terminals in the mucosal layer of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

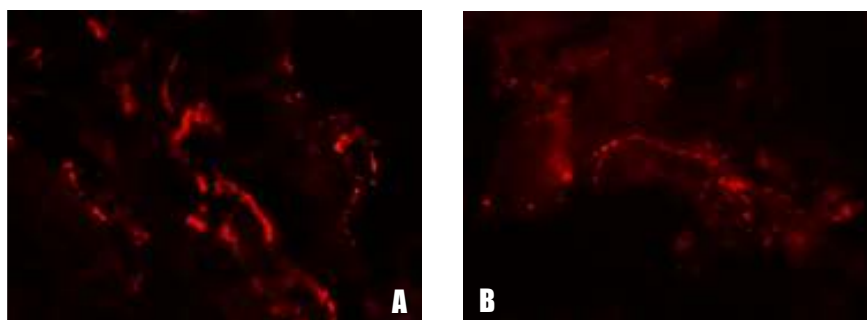
**A** *Without signs of inflammation*

**B** *Patient suffering with UC. Note the diminished density of PACAP-containing nerve profiles in comparison with their density observed in the mucosa from non-inflamed bowel*

Tab. 38. Liczebność włókien nerwowych VIP-IR w badanych grupach: I – dzieci chorych na UC i II – porównawczej

*Tab. 38. The numerical force of VIP-IR nerve fibres in studied groups I and II*

VIP-IR	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Grupa I <i>Group I</i>	20,2	33	5,53	11,3	41,4	17,2	19,7	22,8
Grupa II <i>Group II</i>	36,1	9	16,01	14,7	58,1	20,9	39,3	44,4
Ogółem <i>Total</i>	23,6	42	10,84	11,3	58,1			



Ryc. 14. Obraz włókien VIP-IR w śluzówce jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba terminali VIP-IR w śluzówce jelita w porównaniu z liczbą włókien u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 14. Distribution pattern of VIP-IR nerve terminals in the mucosal layer of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** *Without signs of inflammation*

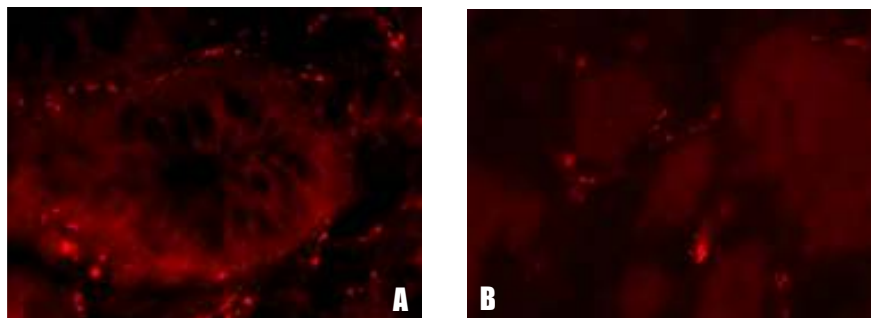
**B** *Patient suffering with UC. Note the diminished density of VIP-containing nerve profiles in comparison with their density observed in the mucosa from non-inflamed bowel*

Zachodzi różnica w liczebności włókien VIP-IR w obu grupach. W grupie porównawczej (N=9) jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie chorych (test U; U=61,0; p<0,007)

**Tab. 39. Liczebność włókien nerwowych GAL-IR w badanych grupach: I – dzieci chorych na UC i II – porównawczej**

**Tab. 39. The numerical force of GAL-IR nerve fibres in studied groups I and II**

GAL-IR	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Grupa I <i>Group I</i>	4,4	33	2,51	1,3	13,9	3,0	3,8	5,3
Grupa II <i>Group II</i>	11,2	9	5,58	4,7	20,9	5,8	11,8	13,4
Ogółem <i>Total</i>	5,8	42	4,36	1,3	20,9			



Ryc. 15. Obraz włókien GAL-IR w śluzówce jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciało za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

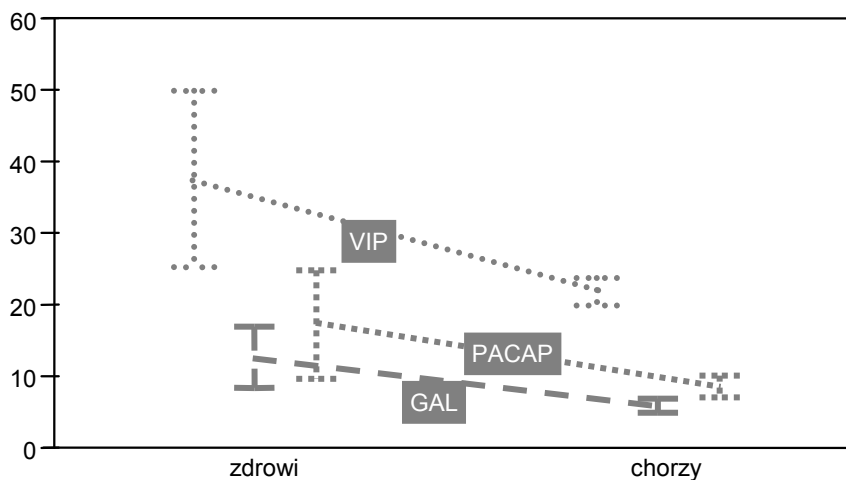
**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba terminali GAL-IR w śluzówce jelita w porównaniu z liczbą włókien u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 15. Distribution pattern of VIP-IR nerve terminals in the mucosal layer of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** Without signs of inflammation

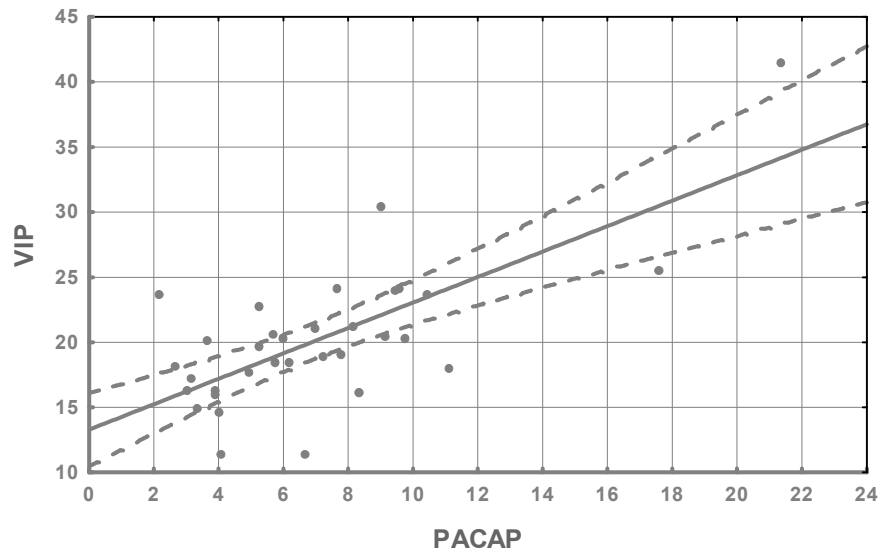
**B** Patient suffering with UC. Note the diminished density of GAL-containing nerve profiles in comparison with their density observed in the mucosa from non-inflamed bowel

Zachodzi różnica w liczebności włókien GAL-IR w obu grupach. W grupie porównawczej (N=9) jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie chorych (test U; U=34,0; p<0,001)



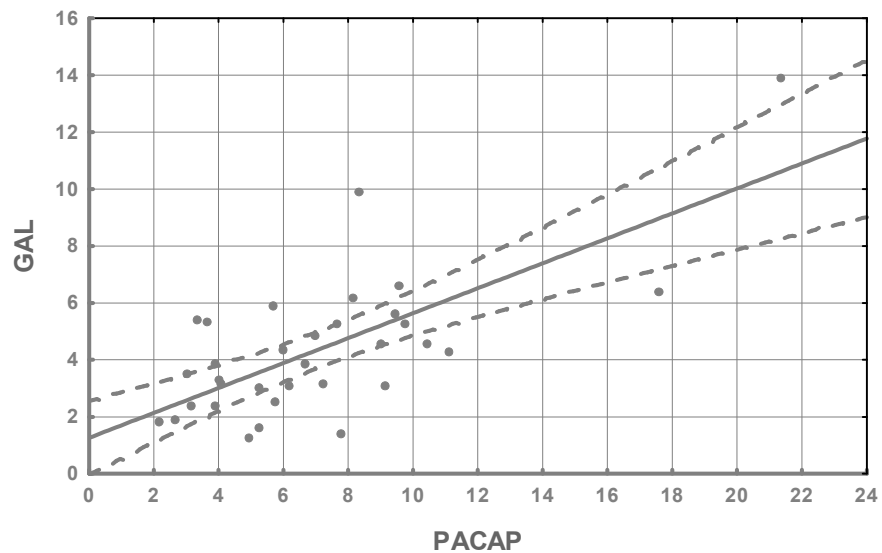
Ryc. 16. Liczebność włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP i GAL w badanych grupach I i II

*Fig. 16. The numeric force of PACAP, VIP and GAL nerve fibres -IR in studied groups I and II*



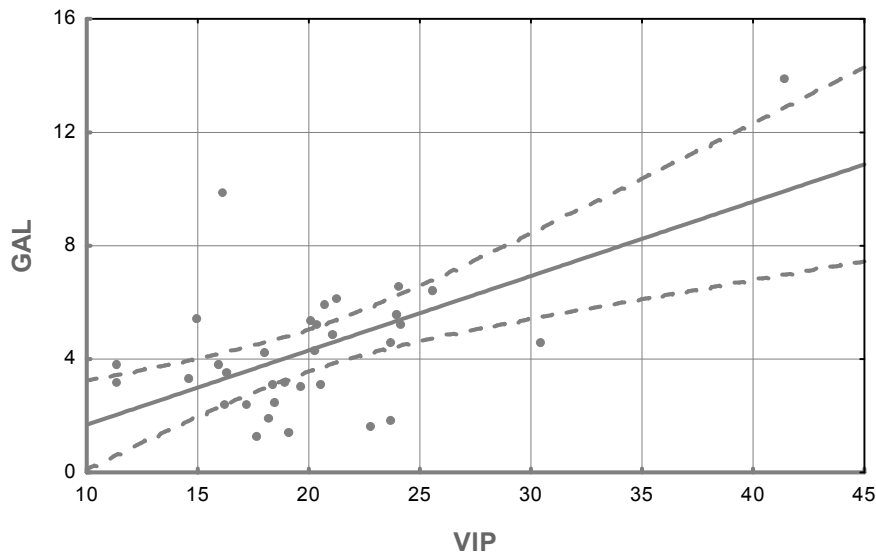
Ryc. 17. Liczebność włókien nerwowych VIP-IR w zależności od liczebności włókien nerwowych PACAP-IR u osób chorych z grupy I

Fig. 17. The numeric force of VIP-IR nerve fibres depending on the numeric force PACAP-IR nerve fibres in patients from group I



Ryc. 18. Liczebność włókien nerwowych GAL-IR w zależności od liczebności włókien nerwowych PACAP-IR u osób chorych z grupy I

Fig. 18. The numeric force of GAL-IR nerve fibres depending on the numeric force PACAP-IR nerve fibres in patients from group I



**Ryc. 19. Liczebność włókien nerwowych GAL-IR w zależności od liczebności włókien nerwowych VIP u osób chorych z grupy I**

**Fig. 19. The numeric force of GAL-IR nerve fibres depending on the numeric force VIP nerve fibres in patients from group I**

Wielkości liczebności włókien -IR: PACAP VIP i GAL są ze sobą związane dość znacznie, chociaż trudno ustalić statystyczne wskaźniki tej zależności. Współczynniki korelacji  $\tau$ -Kendalla są statystycznie istotnie niezerowe na poziomie  $p$  mniejszym niż 0,01 i wynoszą  $\tau$  (PACAP, VIP)=0,38,  $\tau$  (PACAP, GAL)=0,38,  $\tau$  (VIP, GAL)=0,27.

**Tab. 40. Zależność pomiędzy liczebnością włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP i GAL a aktywnością UC u osób chorych z grupy I**

**Tab. 40. The dependence between the numerical force of PACAP, VIP and GAL-IR nerve fibres and UC activity in patients from group I**

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	PACAP-IR			VIP-IR			GAL-IR		
	Średnie Mean	N	SD	Średnie Mean	N	SD	Średnie Mean	N	SD
Łagodna <i>Mild</i>	5,6	16	2,4	18,8	16	3,5	3,8	16	1,4
Umiarkowana <i>Moderate</i>	8,3	15	5,2	21,6	15	7,2	4,9	15	3,4
Ciężka <i>Severe</i>	9,5	2	0,4	20,4	2	0,1	4,2	2	1,5
Ogółem <i>Total</i>	7,1	33	4,1	20,2	33	5,5	4,4	33	2,5

Nie obserwujemy statystycznie znaczących zmian liczebności włókien -IR: PACAP, VIP i GAL w różnych stopniach aktywności UC.

**Tab. 41. Liczebność włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP i GAL w zależności od występowania biegunki u chorych z grupy I**

**Tab. 41. The numerical force of PACAP, VIP and GAL-IR nerve fibres depending on the diarrhoea incidence in patients from group I**

Objawy biegunki <i>Diarrhoea symptoms</i>	N	PACAP-IR		VIP-IR		GAL-IR	
		Średnie Mean	SD	Średnie Mean	SD	Średnie Mean	SD
Nie było <i>None</i>	8	7,6	2,2	21,6	4,5	4,7	0,9
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	25	6,9	4,5	19,7	5,8	4,3	2,8
Ogółem <i>Total</i>	33	7,1	4,1	20,2	5,5	4,4	2,5

Nie stwierdzamy różnic w liczebności włókien -IR: PACAP, VIP i GAL w zależności od występowania objawu biegunki.

**Tab. 42. Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR w zależności od występowania biegunki u chorych z grupy I**

**Tab. 42. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres' nerve fibres depending on the diarrhoea incidence in patients from group I**

Objawy biegunki <i>Diarrhoea symptoms</i>	PACAP-IR							
	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Nie było <i>None</i>	7,6	8	2,2	3,9	11,1	6,3	7,5	9,2
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	6,9	25	4,5	2,2	21,3	3,9	5,8	8,3
Ogółem <i>Total</i>	7,1	33	4,1	2,2	21,3	4,0	6,2	9,0

**Tab. 43. Liczebność włókien nerwowych VIP-IR w zależności od występowania biegunki u chorych z grupy I**

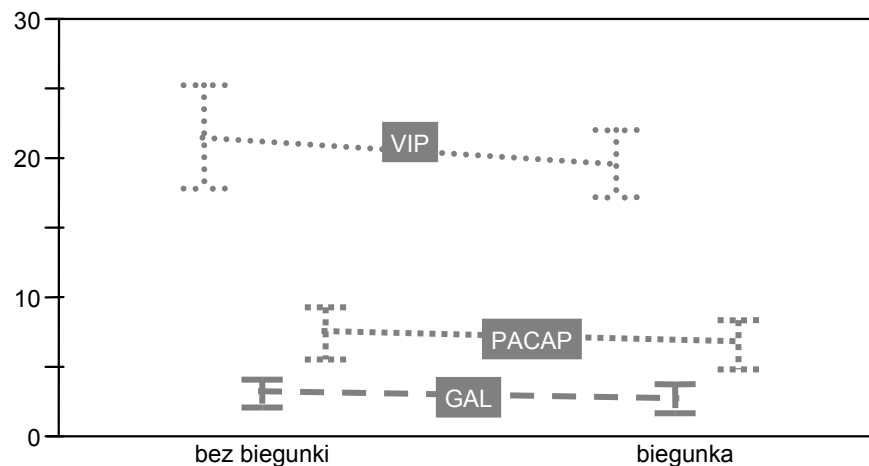
**Tab. 43. The numerical force of VIP-IR nerve fibres depending on the diarrhoea incidence in patients from group I**

Objawy biegunki <i>Diarrhoea symptoms</i>	VIP-IR							
	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Nie było <i>None</i>	21,6	8	4,5	15,9	30,4	18,5	20,9	24,0
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	19,7	25	5,8	11,3	41,4	16,3	19,1	21,3
Ogółem <i>Total</i>	20,2	33	5,5	11,3	41,4	17,2	19,7	22,8

**Tab. 44. Liczebność włókien nerwowych GAL-IR w zależności od występowania biegunki u chorych z grupy I**

**Tab. 44. The numerical force of GAL-IR nerve fibres depending on the diarrhoea incidence in patients from group I**

Objawy biegunki <i>Diarrhoea symptoms</i>	GAL-IR							
	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Nie było <i>None</i>	4,7	8	0,9	3,2	6	4,0	4,7	5,4
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	4,3	25	2,8	1,3	14	2,4	3,3	5,3
Ogółem <i>Total</i>	4,4	33	2,5	1,3	14	3,0	3,8	5,3



**Ryc. 20. Liczebność włókien nerwowych -IR:VIP, PACAP i GAL w zależności od występowania biegunki u chorych z grupy I**

**Fig. 20. The numeric force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres depending on the diarrhoea incidence in patients from group I**

W każdym z powyższych analizowanych zależności pomiędzy liczebnością włókien -IR: PACAP, VIP i GAL i występowaniem biegunki w grupie chorych (N=33) nie stwierdzamy różnic znamiennych statystycznie.

Przeprowadzając bardziej szczegółową analizę opartą o klasyfikację kwantylową neurotransmitterów i analizę opartą o wartości mediany dla PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR stwierdzono patologiczne przekroczenia liczebności włókien nerwowych badanych neurotransmitterów u chorych, którzy mieli biegunkę. Zależności te dotyczyły liczebności włókien nerwowych PACAP-IR i GAL-IR.

**Tab. 45. Klasyfikacja kwantylowa liczebności włókien nerwowych PACAP-IR i biegunki u osób chorych z grupy I**

**Tab. 45. The quantil classification of PACAP-IR nerve fibres' numerical force and diarrhoea incidence in patients from group I**

PACAP-IR	Bez biegunki <i>Without diarrhoea</i>		Biegunka <i>Diarrhoea</i>		Ogółem <i>Total</i>
	N	%	N	%	N
PACAP-	6	75	10	40	16
PACAP+	2	25	15	60	17
Ogółem <i>Total</i>	8	100	25	100	33

Większą liczebność włókien PACAP-IR stwierdzamy u chorych, którzy mieli biegunkę (exact test 5%;  $N\alpha=3$ ;  $N=17$ ;  $p<0,009$ ).

**Tab. 46. Klasyfikacja kwantylowa liczebności włókien nerwowych GAL-IR i biegunki u osób chorych z grupy I**

**Tab. 46. The quantil classification of GAL-IR nerve fibres' numerical force and diarrhoea incidence in patients from group I**

GAL-IR	Bez biegunki <i>Without diarrhoea</i>		Biegunka <i>Diarrhoea</i>		Ogółem <i>Total</i>
	N	%	N	%	N
GAL-	6	75	10	40	16
GAL+	2	25	15	60	17
Ogółem <i>Total</i>	8	100	25	100	33

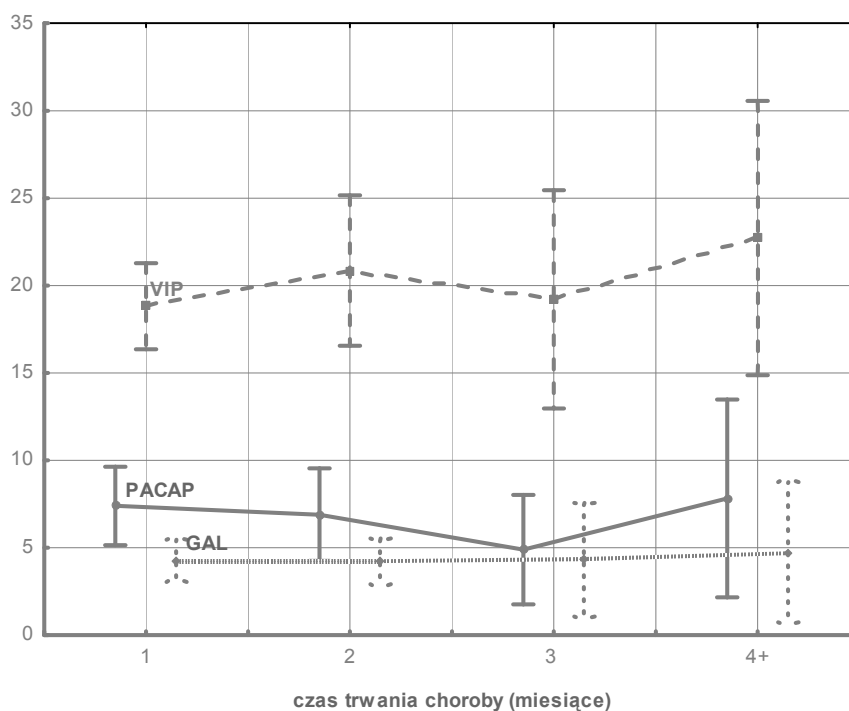
Większą liczebność włókien GAL-IR stwierdzamy u chorych, którzy mieli biegunkę (exact test 5%;  $N\alpha=3$ ;  $N=17$ ;  $p<0,009$ )



**Tab. 47. Zależność liczebności włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP i GAL u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby.**

**Tab. 47. The numerical force of PACAP, VIP and GAL-IR nerve fibres in patients depending of the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące) <i>Disease duration in months</i>	N	PACAP-IR		VIP-IR		GAL-IR	
		Średnie Mean	SD	Średnie Mean	SD	Średnie Mean	SD
1	14	7,4	3,9	19	4,3	4,2	2,1
2	8	6,9	3,2	21	5,1	4,2	1,6
3	4	4,9	2,0	19	3,9	4,3	2,0
≥4	7	7,8	6,1	23	8,5	4,7	4,3
Ogółem w grupie <i>Totally in group</i>	33	7,1	4,1	20	5,5	4,4	2,5



**Ryc. 21. Zależność wartości średnich liczebności włókien nerwowych neurotransmiterów -IR: PACAP, VIP i GAL u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby do rozpoznania**

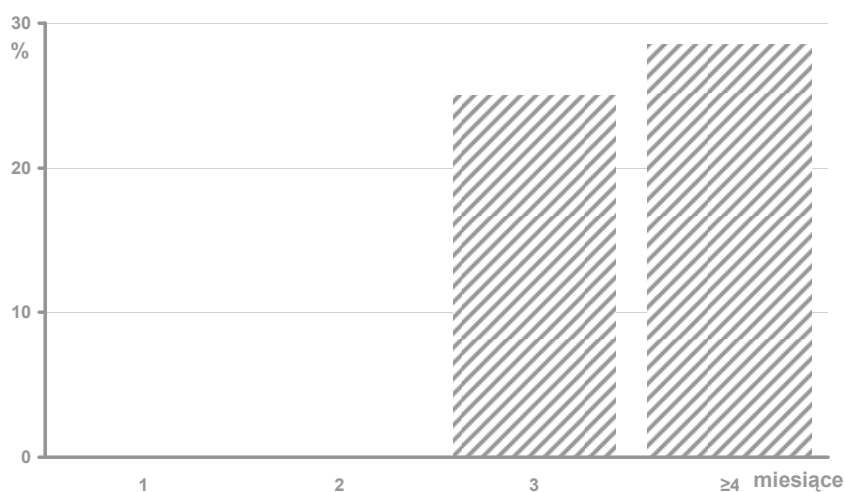
**Fig. 21. The neurotransmitters' -IR: PACAP, VIP and GAL levels depending on the disease duration before the diagnosis was made in patients from group I.**

Ze względu na niewielkie liczebności w grupach nie możemy wskazać na zależności statystyczne czasu trwania choroby i wartości średnich liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR, niemniej jednak częstość przynależności do grup kwantylowych GAL-IR pozwala wysnuć pewne wnioski. Przypomnijmy, że GAL10 oznacza, że stwierdzono obniżenie liczebności włókien nerwowych poniżej 10% od wartości średnich.

**Tab. 48. Zależność wartości średnich liczebności włókien nerwowych GAL-IR u osób chorych z grupy I od czasu trwania choroby**

**Tab. 48. The mean values of numerical force of GAL-IR nerve fibres in patients from group I depending of the disease duration**

Czas trwania choroby (miesiące) <i>Disease duration in months</i>	GAL-IR		GAL		Ogółem <i>Total</i>
	GAL10+	%	GAL10-	%	
1	14	100,00	0	0,00	14
2	8	100,00	0	0,00	8
3	3	75,00	1	25,00	4
≥4	5	71,43	2	28,57	7
Ogółem w grupie <i>Totally in group</i>	30		3		33



**Ryc. 22. Zależności wartości średnich liczebności włókien nerwowych GAL-IR u osób chorych z grupy I (w% pacjentów poniżej 10% kwantyla GAL) od czasu trwania choroby**

**Fig. 22. The mean numeric force of GAL-IR nerve fibres depending on the disease duration in patients from group I (in% of patients under the 10% GAL quantil)**

W dłuższym czasie trwania choroby stwierdza się obniżenie liczebności włókien nerwowych GAL-IR, np. dla osób chorujących 3 lub więcej miesięcy znalazły się w tej analizowanej zależności 3 przypadki z patologicznym obniżeniem liczebności włókien, a w krótszym czasie trwania choroby nie ma pacjentów, u których tę zależność analizowano (exact test 5%;  $N\alpha=2$ ;  $N=11$ ;  $p<0,015$ ). Jest to słaba decyzja statystyczna. Następnie analizie poddano zależność ilości włókien nerwowych -IR PACAP, VIP i GAL u 32 pacjentów

z grupy I (N=33) od stosowanej terapii. Jeden pacjent w czasie włączenia do badań nie był leczony poniższymi lekami.

**Tab. 49a. Zależność liczebności włókien PACAP-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

*Tab. 49a. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on the treatment used in group I*

Leczenie <i>Treatment</i>	PACAP							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
5-ASA	5,9	12	2,6	2,7	11	3,8	5,5	7,6
Sterydy <i>Steroids</i>	7,0	9	4,7	3,0	18	3,9	5,8	9,0
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	8,3	11	4,9	2,2	21	5,3	7,8	9,6
Ogółem <i>Total</i>	7,0	32	4,1	2,2	21	4,0	6,1	9,1

**Tab. 49b. Zależność liczebności włókien PACAP-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

*Tab. 49b. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on the treatment used in group I*

Leczenie <i>Treatment</i>	PACAP-		PACAP+		Ogółem <i>Total</i>
	n	%	n	%	
5-ASA	5	33,33	7	41,18	12
Sterydy <i>Steroids</i>	3	20,00	6	35,29	9
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	7	46,67	4	23,53	11
Ogółem <i>Total</i>	15	100,00	17	100,00	32

**Tab. 50a. Zależność liczebności włókien VIP-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

*Tab. 50a. The numerical force of VIP-IR nerve fibres depending of the treatment used in group I*

Leczenie <i>Treatment</i>	VIP							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
5-ASA	18,3	12	3,54	11,3	23,9	15,4	18,9	20,9
Sterydy <i>Steroids</i>	19,9	9	5,77	11,3	30,4	16,3	18,5	23,7
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	22,1	11	6,89	16,1	41,4	18,4	20,3	23,7
Ogółem <i>Total</i>	20,1	32	5,57	11,3	41,4	16,7	19,4	22,0

**Tab. 50b. Zależność liczebności włókien VIP-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

**Tab. 50b. The numerical force of VIP-IR nerve fibres depending on the treatment used in group I**

Leczenie <i>Treatment</i>	VIP-		VIP+		Ogółem <i>Total</i>
	n	%	n	%	
5-ASA	5	33,33	7	41,18	12
Sterydy <i>Steroids</i>	4	26,67	5	29,41	9
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	6	40,00	5	29,41	11
Ogółem <i>Total</i>	15	100,00	17	100,00	32

**Tab. 51a. Zależność liczebności włókien GAL-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

**Tab. 51a. The numerical force of GAL-IR nerve fibres depending on the treatment used in group I**

Leczenie <i>Treatment</i>	GAL							
	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
5-ASA	4,5	12	1,3	1,9	6,2	3,6	4,5	5,5
Sterydy <i>Steroids</i>	3,8	9	1,3	2,4	6,4	2,5	3,5	4,6
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	4,6	11	4,0	1,3	13,9	1,6	3,1	6,6
Ogółem <i>Total</i>	4,3	32	2,5	1,3	13,9	2,8	3,8	5,4

**Tab. 51b. Zależność liczebności włókien GAL-IR od stosowanej terapii u osób chorych z grupy I**

**Tab. 51b. The numerical force of GAL-IR nerve fibres depending of the treatment used in group I**

Leczenie <i>Treatment</i>	GAL-		GAL+		ogółem <i>total</i>
	n	%	n	%	
5-ASA	7	46,67	5	29,41	12
Sterydy <i>Steroids</i>	4	26,67	5	29,41	9
Azathiopryna <i>Azathioprine</i>	4	26,67	7	41,18	11
Ogółem <i>Total</i>	15	100,00	17	100,00	32

W analizie zależności liczebności włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP i GAL od stosowania 5-ASA, sterydów i preparatów immunosupresyjnych, nie otrzymano żadnych istotnych statystycznie wyników. W średnich wartościach liczby włókien nie stwierdzono różnic statystycznych. Analiza statystyczna wykazała dość słabo i bez potwierdzeń w postaci wskaźników, że liczebność włókien nerwowych PACAP-IR i VIP-IR jest obniżona, a liczebność włókien nerwowych GAL-IR podwyższona w trakcie leczenia immunosupresyjnego. Przy stosowaniu 5-ASA stwierdza się odwrotną zależność – liczebność włókien nerwowych w śluzówce jelita PACAP-IR i VIP-IR jest podwyższona, a liczebność włókien nerwowych GAL-IR obniżona. Nie stwierdza się zależności od liczebności włókien nerwowych IR-PACAP, VIP i GAL w trakcie stosowania preparatów sterydowych.

**Tab. 52. Liczebność włókien nerwowych GAL-IR u osób chorych z grupy I w zależności od stosowania probiotyków**

**Tab. 52. The numerical force of GAL-IR nerve fibres in patients from group I (N=33) depending on the use of probiotics**

Probiotyk <i>Probiotics</i>	GAL Q90-		GAL Q90+		Ogółem <i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
Nie stosowano <i>Not applied</i>	12	100,00	0	0,00	12	100,00
Stosowano <i>Applied</i>	18	85,71	3	14,29	21	100,00
Ogółem <i>Total</i>	30		3		33	

U chorych, którzy otrzymywali probiotyk, stwierdza się zwiększoną ilość włókien nerwowych GAL-IR (powyżej Q90+). Natomiast u pacjentów nie otrzymujących probiotyku, takiej zależności nie stwierdza się (exact test 5%; N=3; N=21; p<0,019).

**Tab. 53. Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR u osób chorych z grupy I w zależności od stosowania probiotyków**

**Tab. 53. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres in patients from group I depending on the use of probiotics**

Probiotyk <i>Probiotics</i>	PACAP Q90-		PACAP Q90+		Ogółem	
	N	%	N	%	N	%
Nie stosowano <i>Not applied</i>	12	100,00	0	0,00	12	100,00
Stosowano <i>Applied</i>	18	85,71	3	14,29	21	100,00
Ogółem <i>Total</i>	30		3		33	

U chorych, którzy otrzymywali probiotyk, stwierdza się zwiększoną ilość włókien nerwowych PACAP-IR (powyżej Q90+). Natomiast u pacjentów nie otrzymujących probiotyku, takiej zależności nie stwierdza się. Ponadto nie stwierdza się zależności pomiędzy przyjmowaniem probiotyku, a ilością włókien nerwowych VIP-IR (exact test 5%; N=3; N=21; p<0,019).

### V część wyników

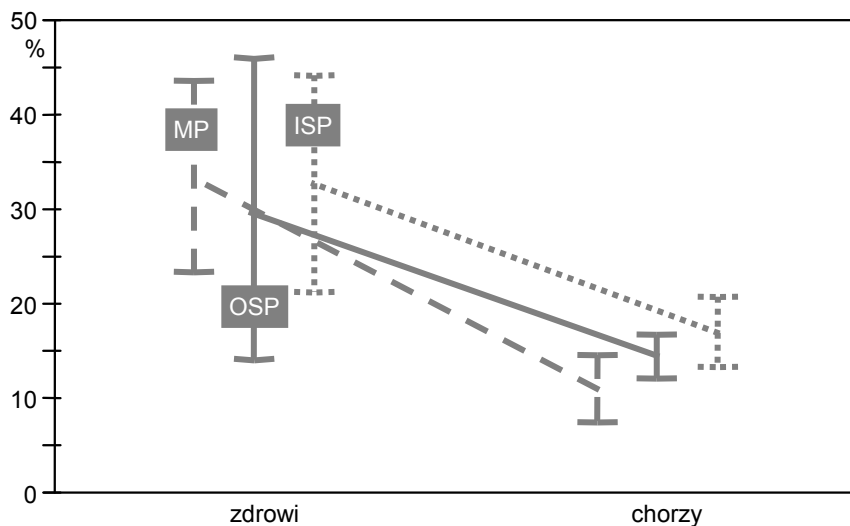
Ocena liczebności włókien immunoreaktywnych w śluzówce i mięśniówce jelita grubego oraz komórek pozytywnych VIP, PACAP i GAL w zwojach ściany jelita u chorych po kolektomii

**Tab. 54. Liczba włókien immunoreaktywnych w mięśniówce i komórek VIP pozytywnych w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III**

*Tab. 54. The number of nerve fibres IR in muscular layer and VIP-positive cells in intestinal wall ganglions after colectomy in groups Ia and III*

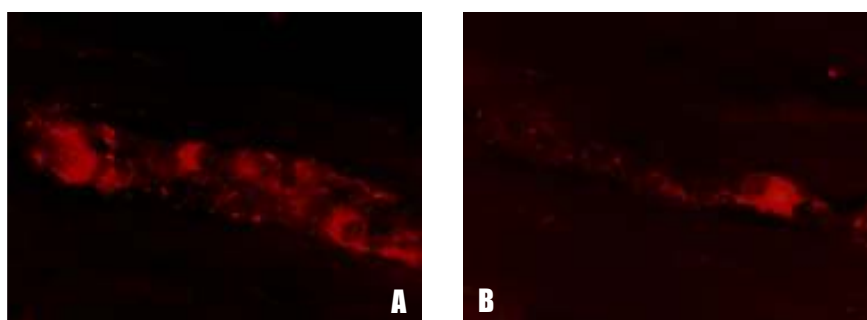
VIP	Średnia Mean		N		SD		Test U
	Ia	III	Ia	III	Ia	III	
Mięśniówka <i>Muscular layer</i>	29,97	68,26	7	3	7,804	4,576	p<0,017
MP%*	11,2%	33,6%	7	3	3,5%	4,0%	p<0,017
OSP%*	14,5%	29,6%	7	3	2,5%	6,3%	p<0,017
ISP%*	17,1%	32,6%	7	3	4,1%	4,6%	p<0,017

\*MP (zwój mięśniówkowy Auerbacha), OSP (zwój podśluzówkowy zewnętrzny Schabadascha), ISP (zwój podśluzówkowy wewnętrzny Meissnera).



Ryc. 23. Odsetek komórek VIP pozytywnych w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III

Fig. 23. The percentage of VIP-positive cells in intestinal wall after colectomy in groups Ia and III



Ryc. 24. Obraz komórek VIP-pozytywnych w zwoju MP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

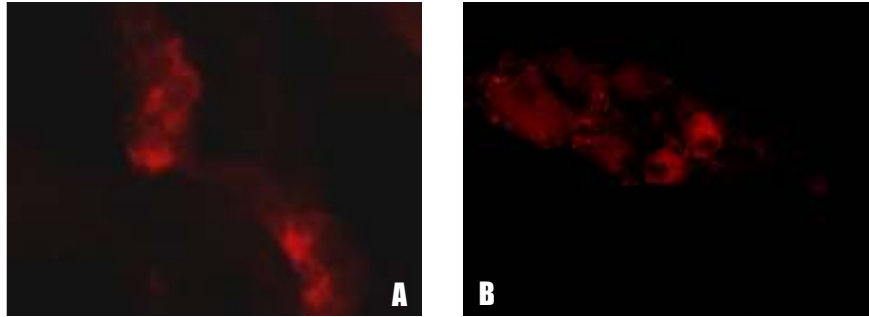
**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek VIP-IR w zwoju MP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek VIP-IR w zwoju u pacjenta bez stanu zapalnego

Fig. 24. Distribution pattern of VIP-IR neurons in the MP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the MP from non-inflamed bowel





Ryc. 25. Obraz komórek VIP-pozytywnych w zwoju OSP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

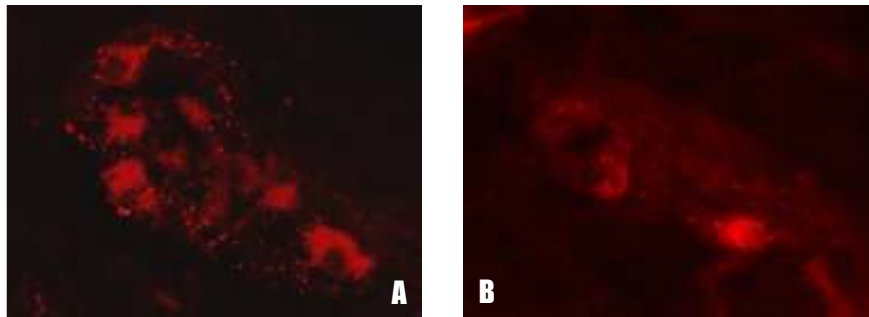
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek VIP-IR w zwoju OSP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek VIP-IR w zwoju OSP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 25. Distribution pattern of VIP-IR neurons in the OSP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the OSP from non-inflamed bowel



Ryc. 26. Obraz komórek VIP-pozytywnych w zwoju ISP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

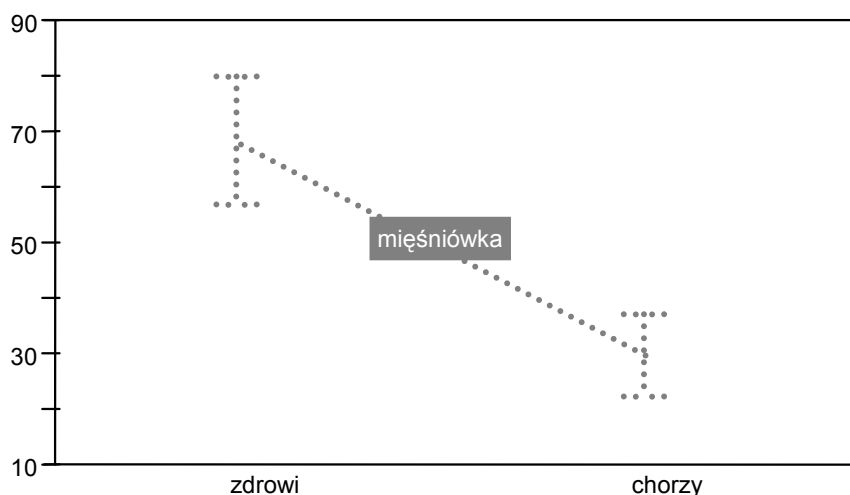
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek VIP-IR w zwoju ISP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek VIP-IR w zwoju ISP u pacjenta bez stanu zapalnego

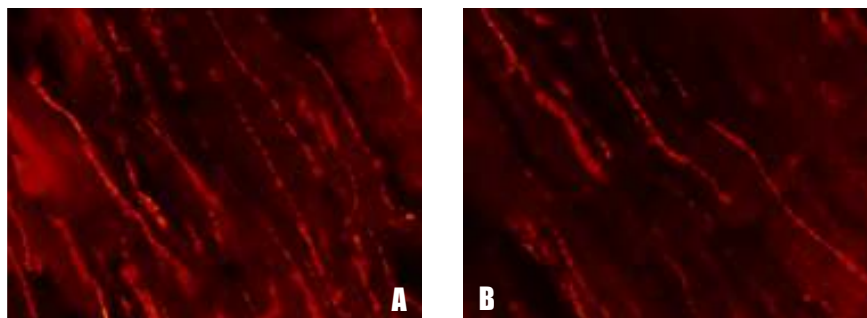
*Fig. 26 Distribution pattern of VIP-IR neurons in the ISP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the ISP from non-inflamed bowel



Ryc. 27. Liczba włókien VIP-IR w mięśniówce ściany jelita po kolektomii w grupie I a i III  
 Fig. 27. The number of VIP-IR nerve fibres in muscular layer of intestine after colectomy in groups Ia and III



Ryc. 28. Włókna VIP-IR w mięśniówce resektowanego jelita grubego. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna obniżona liczebność włókien w porównaniu z liczbą włókien VIP-IR w mięśniówce u pacjenta bez stanu zapalnego

Fig. 28. Distribution pattern of VIP-IR nerve terminals in the muscular layer of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished density of nerve profiles containing VIP, in comparison with their density observed in the mucosa from non-inflamed bowel

W przypadkach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego obserwowano bardzo znaczny spadek liczebności komórek VIP-pozytywnych (11,2%, 14,5% i 17,1% odpowiednio w zwojach MP, OSP i ISP), w porównaniu z grupą kontrolną (33,6%, 29,6%, 32,6% w odpowiednio w zwojach MP, OSP i ISP). Gęstość włókien VIP-IR w mięśniówce jelita różniła się znacząco między grupa-

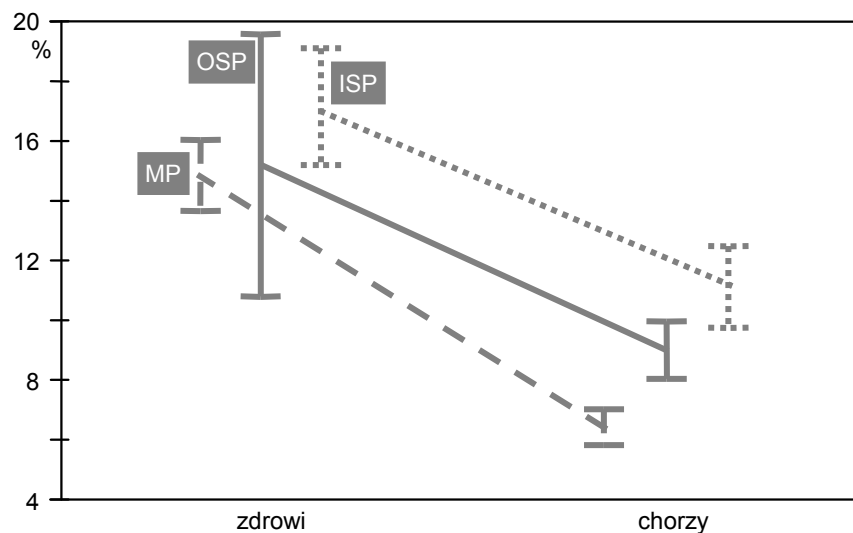
mi; u osób z grupy porównawczej (68,26 włókna/pole widzenia) i wśród chorych z UC (29,97 włókna/pole widzenia), gdzie w grupie chorych uległa znacznemu obniżeniu.

**Tab. 55. Liczba włókien w mięśniówce i komórek PACAP pozytywnych w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III**

**Tab. 55. The number of fibres in muscular layer and VIP-positive cells in intestinal wall ganglions after colectomy in groups Ia and III**

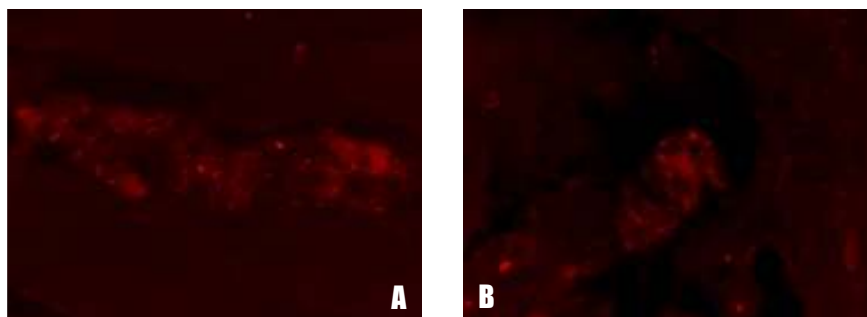
PACAP	Średnia Mean		n		SD		Test U
	Chorzy III	Zdrowi Healthy	Chorzy III	Zdrowi Healthy	Chorzy III	Zdrowi Healthy	
Mięśniówka* Muscular layer	11,05	24,37	7	3	4,31	3,72	p<0,017
MP%*	6,4%	14,9%	7	3	0,7%	0,5%	p<0,017
OSP%*	9,0%	15,2%	7	3	1,0%	1,8%	p<0,017
ISP%*	11,1%	17,1%	7	3	1,5%	0,8%	p<0,017

\*MP (zwój mięśniówkowy Auerbacha), OSP (zwój podśluzówkowy zewnętrzny Schabadascha), ISP (zwój podśluzówkowy wewnętrzny Meissnera).



**Ryc. 29. Odsetek komórek PACAP pozytywnych w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III**

**Fig 29. The percentage of PACAP – positive cells in intestinal wall ganglions after colectomy in groups Ia and II**



Ryc. 30. Obraz komórek PACAP-pozytywnych w zwoju MP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

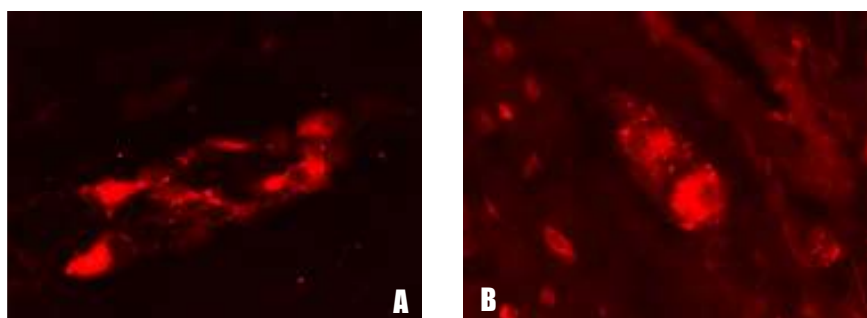
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek PACAP-IR w zwoju MP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek PACAP-IR w zwoju MP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 30 Distribution pattern of PACAP-positive neurons in the MP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

*A Without signs of inflammation*

*B Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the MP from non-inflamed bowel*



Ryc. 31. Obraz komórek PACAP-pozytywnych w zwoju OSP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

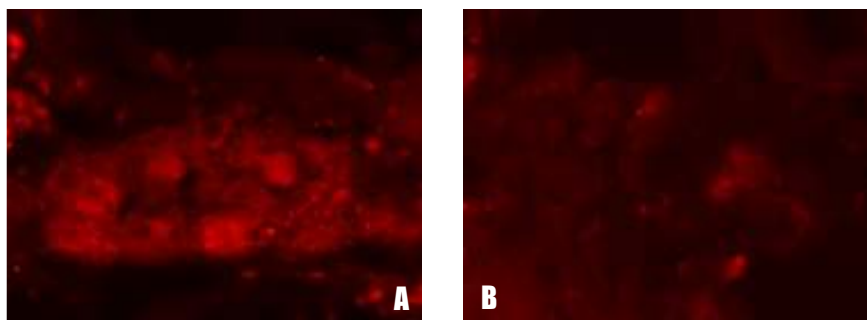
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek PACAP-IR w zwoju OSP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek PACAP-IR w zwoju OSP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 31 Distribution pattern of PACAP-positive neurons in the OSP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

*A Without signs of inflammation*

*B Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the OSP from non-inflamed bowel*



Ryc. 32. Obraz komórek PACAP-pozytywnych w zwoju ISP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

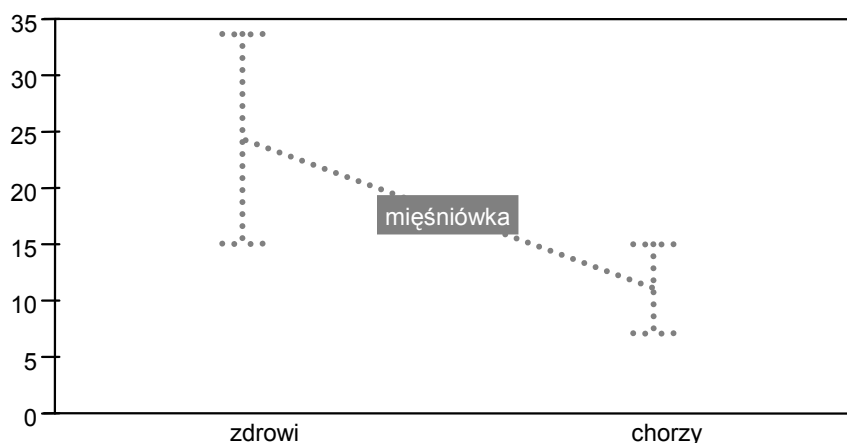
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek PACAP-IR w zwoju ISP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek PACAP-IR w zwoju OSP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 32. Distribution pattern of PACAP-positive neurons in the ISP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

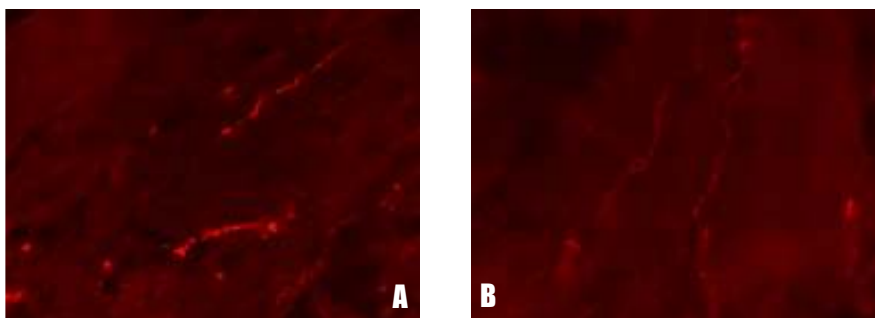
**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing VIP, in comparison with their number observed in the ISP from non-inflamed bowel



Ryc. 33. Liczba włókien PACAP-IR w mięśniówce ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III

*Fig. 33. The number of PACAP-fibres in muscular layer of intestine after colectomy in groups Ia and III*



Ryc. 34. Włókna PACAP-IR w mięśniówce resektowanego jelita grubego. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna obniżona liczebność włókien w porównaniu z liczbą włókien PACAP-IR w mięśniówce u pacjenta bez stanu zapalnego

**Fig. 34. PACAP-IR intramuscular nerve fibres in a patient undergoing pancolectomy. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)**

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of GAL-IR profiles as compared to the picture observed in a sample from patient without signs of large bowel inflammation

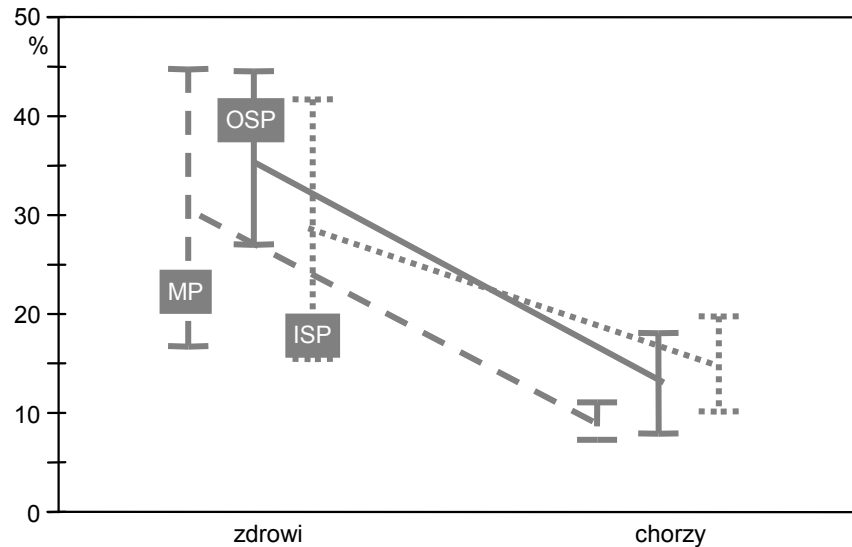
W przypadkach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego obserwowano bardzo znaczny spadek liczebności komórek PACAP-pozytywnych (6,4%, 9,0%, 11,1% w odpowiednio w zwojach MP, OSP i ISP), w porównaniu z grupą kontrolną (14,9%, 15,2%, 17,1% odpowiednio w MP, OSP i ISP). Gęstość włókien PACAP-IR w mięśniówce jelita różniła się znacząco między grupami; u osób z grupy porównawczej (24,37 włókna/pole widzenia) i wśród chorych z UC (11,05 włókna/pole widzenia), gdzie w grupie chorych uległa znacznemu obniżeniu.

**Tab. 56. Liczba włókien w mięśniówce i komórek pozytywnych GAL w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie Ia i III**

**Tab. 56. The number of fibres in muscular layer and GAL-positive cells in intestinal wall ganglions after colectomy in groups Ia and III**

GAL	Średnia Mean		n		SD		Test U
	Chorzy III	Zdrowi Healthy	Chorzy III	Chorzy III	Zdrowi Healthy	Chorzy III	
Mięśniówka* Muscular layer	5,7	18,42	7	3	4,80	1,78	p<0,017
MP%*	9,2%	30,87%	7	3	1,95%	5,68%	p<0,017
OSP%*	13,0%	36,11%	7	3	5,77%	3,57%	p<0,017
ISP%*	15,0%	28,68%	7	3	5,10%	5,30%	p<0,017

\*MP (zwój mięśniówkowy Auerbacha), OSP (zwój podśluzówkowy zewnętrzny Schabadascha), ISP (zwój podśluzówkowy wewnętrzny Meissnera).



Ryc. 35. Odsetek komórek GAL-pozytywnych w zwojach ściany jelita po kolektomii w grupie badanej Ia i III

Fig. 35. The percentage of GAL-positive cells in intestinal wall ganglia after colectomy in groups Ia and III



Ryc. 36. Obraz komórek GAL-pozytywnych w zwoju MP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

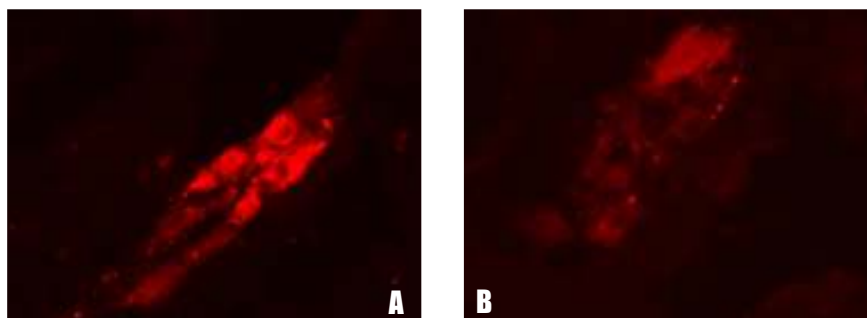
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek GAL-IR w zwoju MP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek GAL-IR w zwoju MP u pacjenta bez stanu zapalnego

Fig. 36. Distribution pattern of GAL-positive neurons in the MP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing GAL, in comparison with their number observed in the MP from non-inflamed bowel



Ryc. 37. Obraz komórek GAL-pozytywnych w zwoju OSP jelita. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

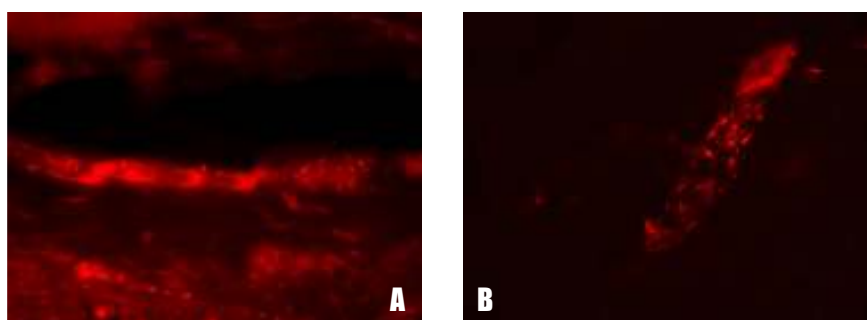
**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek GAL-IR w zwoju OSP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek GAL-IR w zwoju OSP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig. 37. Distribution pattern of GAL-positive neurons in the OSP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing GAL, in comparison with their number observed in the OSP from non-inflamed bowel



Ryc. 38. Komórki GAL-IR w zwoju ISP. Barwienia pojedyncze, wizualizacja kompleksu antygen-przeciwciała za pomocą przeciwciała znakowanego CY3 (materiał własny, powiększenie 240x)

**A** Pacjent bez stanu zapalnego w jelicie grubym

**B** Pacjent z UC – widoczna zmniejszona liczba komórek GAL-IR w zwoju ISP w trakcie procesu chorobowego w porównaniu z liczbą komórek GAL-IR w zwoju ISP u pacjenta bez stanu zapalnego

*Fig.38. Distribution pattern of GAL-positive neurons in the ISP of a bowel sample. Single labelling visualized with CY3 fluorochrome (own material)*

**A** Without signs of inflammation

**B** Patient suffering with UC. Note the diminished number of nerve cell bodies containing GAL, in comparison with their number observed in the ISP from non-inflamed bowel





i wśród chorych z UC (5,7 włókna/pole widzenia), gdzie w grupie chorych uległa znacznemu obniżeniu.

**Tab. 57. Liczebność włókien nerwowych VIP-IR, PACAP-IR, GAL-IR w śluzówce resektowanego jelita u chorych po kolektomii w grupie Ia**  
**Tab. 57. The numerical force of VIP-IR, PACAP-IR and GAL-IR nerve fibres in mucosa of colon after excision in patients from group Ia**

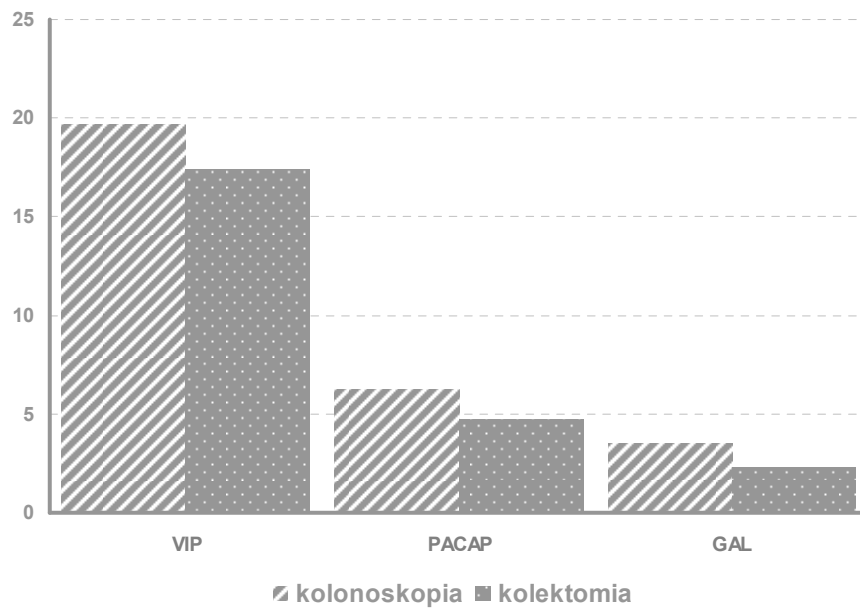
Liczebność włókien nerwowych w śluzówce jelita resektowanego <i>Number of nerve fibres in resected colon</i>	Grupa Ia <i>group Ia</i>	średnia <i>mean</i>	SD
VIP-IR	7	17,4	2,56
PACAP-IR	7	4,7	1,90
GAL-IR	7	2,3	1,52

Przeprowadzono analizę porównania liczebności włókien nerwowych -IR: VIP, PACAP, GAL w śluzówce jelita u chorych po kolektomii (N=7) z liczebnością tych włókien liczonych w wycinkach śluzówki z kolonoskopii, którą u tych chorych wykonano średnio 12 miesięcy wcześniej (wyniki te są zawarte w danych grupy I (N=33) w IV części omawianych wyników).

**Tab. 58. Porównanie wartości średnich liczebności włókien nerwowych -IR: VIP, PACAP, GAL w śluzówce jelita u chorych po kolektomii i wycinkach śluzówki z kolonoskopii w grupie Ia**

**Tab. 58. The comparison of mean values of VIP, PACAP, GAL-IR nerve fibres numeric force in colon mucosa of patients after colectomy and in colonoscopic samples in group Ia**

Wycinek śluzówki <i>Mucous sample</i>	Grupa Ia <i>Group Ia</i>	VIP	PACAP	GAL
Kolonoskopia <i>Colonoscopy</i>	7	19,7	6,3	3,5
kolektomia <i>Colectomy</i>	7	17,4	4,7	2,3

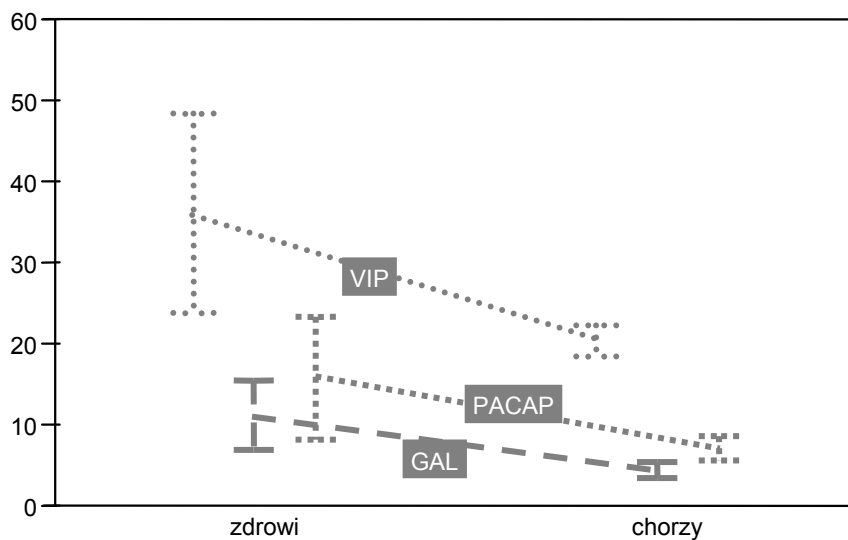


**Ryc. 41. Porównanie średnich liczebności włókien nerwowych -IR: IP, PACAP, GAL w śluzówce jelita u chorych po kolektomii i wycinkach śluzówki jelita grubego z wykonanej wcześniej kolonoskopii w grupie Ia**  
**Fig. 41. The comparison of mean numerical force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres in colon mucosa of patients after colectomy and in colon mucosa samples taken during colonoscopic examinations in group Ia**

Liczebność włókien nerwowych VIP-IR w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii 19,7>17,4 pobranej w trakcie kolektomii (test znaków p<0,023) Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii 6,3>4,7 pobranej w trakcie kolektomii (test znaków p<0,023) Liczebność włókien nerwowych GAL-IR w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii 3,5>2,3 pobranej w trakcie kolektomii (test Wilcoxon; T=2; p<0,43) Stwierdzono, że średnio w okresie 12 miesięcy, które upłynęły od badania liczebności włókien nerwowych w wykonanej wówczas kolonoskopii, u tych 7 pacjentów (grupa Ia) z lekooporną postacią UC u których wykonano kolektomię, liczebność włókien-IR VIP, PACAP i GAL jest znamienne statystycznie mniejsza w śluzowce resekowanego jelita. Przeprowadzono analizę porównawczą liczebności włókien w śluzówce pobranej w trakcie kolonoskopii (pierwsze badanie przed kolektomią) i grupy II porównawczej

**Tab. 59. Liczebność włókien nerwowych -IR VIP, PACAP i GAL w grupie badanej Ia i grupie II (porównawczej) w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii**  
**Tab. 59. The numerical force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres in colon mucosa sampled during colonoscopic examination in groups Ia and II**

Grupa Group	VIP-IR			PACAP-IR			GAL-IR		
	Średnie Mean	N	SD	Średnie Mean	N	SD	Średnie Mean	N	SD
Ia	19,7	7	2,7	6,3	7	2,52	3,5	7	3,15
II	36,1	9	16,0	15,7	9	9,95	11,2	9	5,58

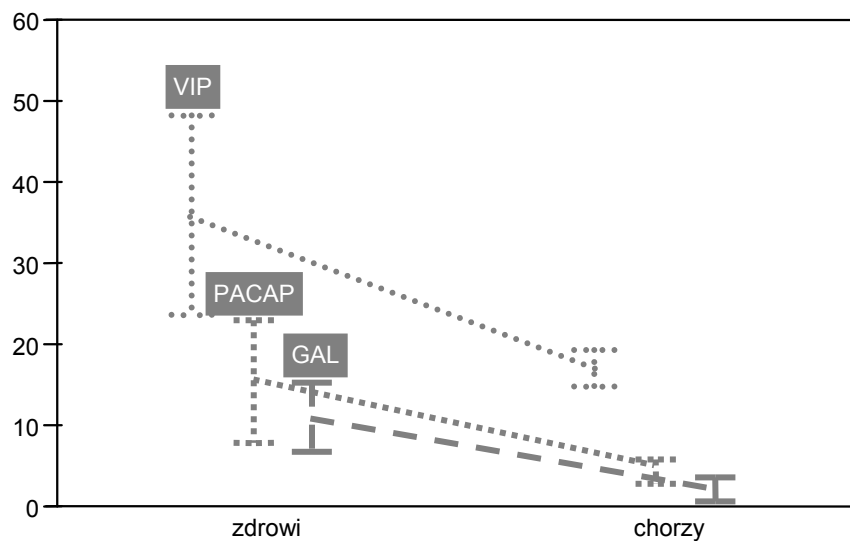


**Ryc. 42. Liczebność włókien nerwowych -IR:VIP, PACAP, GAL w grupie Ia (po kolektomii) i w grupie II (porównawczej) w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii**

**Fig. 42. The numerical force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres in endoscopic colon mucosal samples in groups Ia and II** Przeprowadzono analizę porównawczą liczebności włókien w śluzówce uzyskanej z resektowanego jelita w grupie Ia (N=7) chorych po kolektomii i grupie II porównawczej (N=9)

**Tab. 60. Liczebność włókien nerwowych -IR VIP, PACAP i GAL w grupie I a w śluzówce jelita pobranej z resekowanego jelita i grupie II porównawczej w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii**  
**Tab. 60. The numerical force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres of group I in colon mucosa sampled from the intestine after its excision and in group II in mucosa sampled during colonoscopic examination**

Grupa group	VIP-IR			PACAP-IR			GAL-IR		
	średnie mean	N	SD	średnie mean	N	SD	średnie mean	N	SD
Ia	17,4	7	2,6	4,7	7	1,90	2,3	7	1,52
II	36,1	9	16,0	15,7	9	9,95	11,2	9	5,58



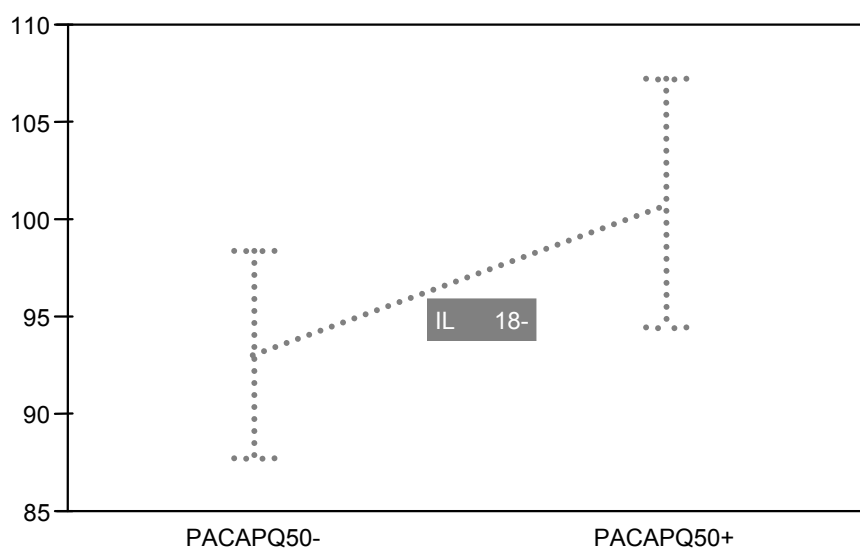
**Ryc. 43. Liczebność włókien nerwowych -IR:VIP, PACAP i GAL w śluzówce jelita pobranej w trakcie kolonoskopii w grupie II porównawczej i grupie badanej Ia w śluzówce jelita pobranej z resekowanego jelita**  
**Fig. 43. The numerical force of VIP, PACAP and GAL-IR nerve fibres in colon mucosa samples taken during endoscopic examination in group II and in colon mucosa of intestine after excision in studied group Ia**

Z przeprowadzonych analiz wynika, że liczba włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP, GAL w grupie Ia (N=7) chorych po kolektomii, jest mniejsza i statystycznie istotna w śluzówce resekowanego jelita w porównaniu z liczbą tych włókien w śluzówce jelita pobranej przy kolonoskopii w grupie II porównawczej (N=9) VI część wyników Ocena stanu jelitowego układu nerwowego w zależności od odpowiedzi immunologicznej organizmów osób chorych na UC w różnych stadiach za-

awansowania schorzenia i w zależności od stosowanej terapii Bezpośrednie badanie związków korelacyjnych, czy globalne porównywanie wartości badanych neurotransmiterów i cytokin nie wskazuje na statystyczne zależności. Przystąpiono do szczegółowej analizy statystycznej i wówczas na pewne związki wskazuje kumulacja cytokin w przedziałach kwantylowych neurotransmiterów. Poniżej zostały wyszczególnione te zależności, które okazały się statystycznie istotne.

**Tab. 61. Zależność liczebności włókien nerwowych PACAP-IR od poziomu ekspresji genu IL-18 w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) u chorych w grupie I**  
**Tab. 61. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on IL-6 gene's expression in colon mucosa (ZM) in patients from group I**

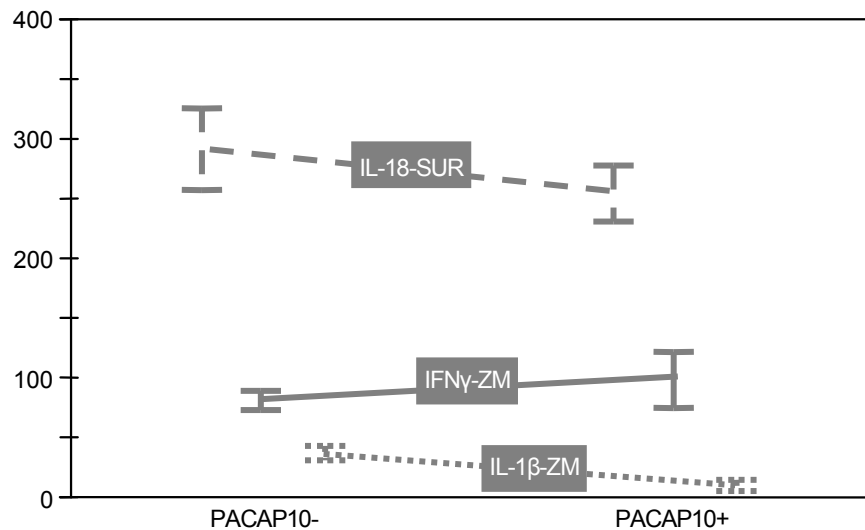
IL-18-ZM	średnia mean		SD		U	poziom p p level
	PACAP+	PACAP-	PACAP+	PACAP-		
	97,98	105,37	8,86	7,43	72,0	0,021



**Ryc. 44. Zależność liczebności włókien nerwowych PACAP-IR od poziomu ekspresji genu IL-18 w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) u chorych w grupie I**  
**Fig. 44. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on the IL-18 gene's expression in colon mucosa (ZM) in patients from group I** W liczebności włókien nerwowych PACAP-IR (powyżej mediany+) i (poniżej mediany-) u dzieci chorych stwierdzono, że poziom IL-18 w zmienionej śluzówce (ZM) jest wyższy dla wartości PACAP-IR powyżej mediany (test U; U=72,0; p<0,021).

**Tab. 62. Zależność liczebności włókien nerwowych PACAP-IR od poziomu ekspresji genu IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) oraz stężenia IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u chorych w grupie I**  
**Tab. 62. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  gene's expression in colon mucosa (ZM) and IL-18 plasma concentration (SUR) in patients from group I**

	Średnia Mean		SD		U	Poziom p level
	PACAP10+	PACAP10-	PACAP10+	PACAP10-		
IL-18-SUR	326,39	253,32	91,91	15,08	21,5	0,044
IFN $\gamma$ -ZM	87,67	100,38	16,65	14,73	21,5	0,044
IL-1 $\beta$ -ZM	40,85	10,82	15,38	1,90	1,5	0,002



**Ryc. 45. Zależność liczebności włókien nerwowych PACAP-IR od poziomu ekspresji genu IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) oraz stężenia IL-18 w surowicy krwi (SUR) pg/ml u chorych w grupie I**  
**Fig. 45. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres depending on the IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  gene's expression in colon mucosa (ZM) and IL-18 plasma concentration in patients from group I**

Przy obniżeniu liczebności włókien nerwowych PACAP-IR (PACAP10-) w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych obserwujemy statystycznie istotnie niższą wartość IL-18 w surowicy krwi (SUR) i w zmienionej śluzówce jelita IL-1 $\beta$  (ZM) oraz podwyższoną wartość IFN $\gamma$  w wycinku śluzówki jelita.

**Tab. 63. Zależność częstości występowania patologicznych przekroczeń poziomu ekspresji genu IL-10 w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) w grupach przekroczeń mediany i liczebności włókien nerwowych PACAP-IR u chorych w grupie I**

*Tab. 63. The frequency of pathological IL-10 expression excess in colon mucosa (ZM) in groups of median and PACAP-IR nerve fibres' numerical force excess in patients from group I*

IL-10-ZM	PACAP+		PACAP-	
	N	%	N	%
Q75-	9	36,0	16	64,0
Q75+	7	87,5	1	12,5
Ogółem <i>Total</i>	16		17	33

Wzrost poziomu IL-10 w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych (ZM) (podwyższenie powyżej Q75+) jest związany z podwyższoną liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR (Fisher exact test;  $p < 0,017$ )

**Tab. 64. Zależność częstości występowania patologicznych przekroczeń poziomu ekspresji genu IL-18 w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) w grupach przekroczeń mediany i liczebności włókien nerwowych PACAP-IR u chorych w grupie I**

*Tab. 64. The frequency of pathological IL-18 expression excess in colon mucosa (ZM) in groups of median and PACAP-IR nerve fibres numerical force excess in patients from group I*

IL-18-ZM	PACAP+		PACAP-	
	N	%	N	%
Q75-	16	59,26%	11	40,74%
Q75+	0	0,0	6	100,0
Ogółem <i>Total</i>	16		17	33

Wzrost poziomu IL-18 w zmienionej śluzówce jelita u dzieci chorych (ZM) (podwyższenie powyżej Q75+) jest związane z obniżoną liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR (Fisher exact test;  $p < 0,018$ )



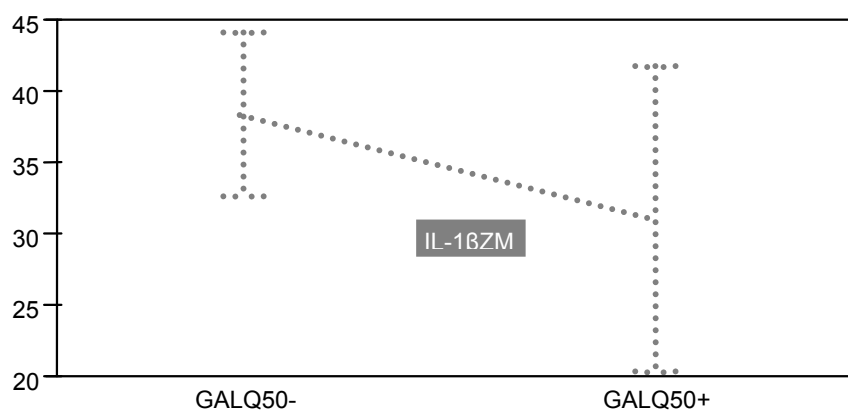
**Tab. 65. Zależność częstości występowania patologicznych przekroczeń stężenia IL-18 w surowicy (SUR) pg/ml krwi w grupach przekroczeń mediany i liczebności włókien nerwowych PACAP-IR u chorych w grupie I**  
**Tab. 65. The frequency of pathological IL-18 expression excess in plasma (SUR) in groups of median and PACAP-IR nerve fibres' numerical force excess in patients from group I**

IL-18-SUR	PACAP-		PACAP+	
	N	%	N	%
Q25+	15	60,0	10	40,0
Q25-	1	12,5	7	87,5
Ogółem <i>Total</i>	16		17	33

Obniżenie poziomu IL-18 w surowicy krwi u dzieci chorych (SUR) (obniżenie poniżej Q25-) jest związane z obniżoną liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR (Fisher exact test;  $p < 0,039$ )

**Tab. 66. Zależność liczebności włókien nerwowych GAL-IR od poziomu ekspresji genu IL-1 $\beta$  w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) u chorych w grupie I**  
**Tab. 66. The dependence between the numerical force of GAL-IR nerve fibres and IL-1 $\beta$  expression in colon mucosa (ZM) in patients from group I**

IL-1 $\beta$ -ZM	średnia <i>mean</i>		SD		U	poziom <i>p level</i>
	GAL+	GAL-	GAL+	GAL-		
	43,77	31,05	10,05	20,85		



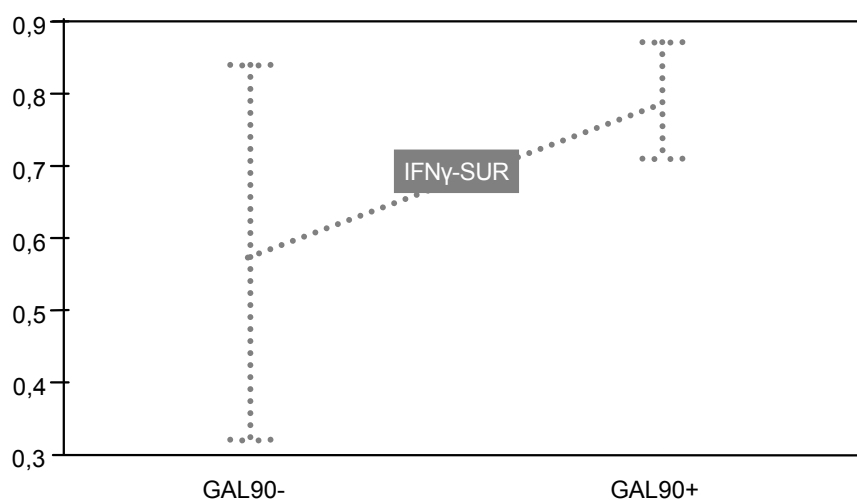
**Ryc. 46. Zależność liczebności włókien nerwowych GAL-IR od poziomu ekspresji genu IL-1  $\beta$  w błonie śluzowej jelita grubego (ZM) u chorych w grupie I**  
**Fig. 46. The numerical force of GAL-IR nerve fibres depending on the IL-1 $\beta$  gene's expression in colon mucosa (ZM) in patients from group I**

W zakresie średniej wartości cytokin stwierdza się, że poziom ekspresji genu IL-1  $\beta$  w zmienionej śluzówce jelita (ZM) u dzieci chorych, jest statystycznie wyższy w przypadku zwiększonej liczby włókien nerwowych GAL-IR (test U;  $U=69,5$ ;  $p<0,017$ ).

**Tab. 67. Zależność liczebności włókien nerwowych GAL-IR od stężenia IFN $\gamma$  w surowicy krwi (SUR) pg/ml u chorych w grupie I**

*Tab. 67. The dependence between the numerical force of GAL-IR nerve fibres and IFN  $\gamma$  concentration in plasma (SUR) of patients from group I*

IFN $\gamma$ -SUR	średnia mean		SD		U	poziom p level
	GAL90-	GAL90+	GAL90-	GAL90+		
	0,58	0,79	0,26	0,08	13,5	0,049



**Ryc. 47. Zależność liczebności włókien nerwowych GAL-IR i stężeniem IFN $\gamma$  w surowicy krwi (SUR) pg/ml u chorych w grupie I**

*Fig. 47. The numerical force of GAL-IR nerve fibres depending on the IFN  $\gamma$  plasma concentration (SUR) in patients from group I*

Przy wyższych wartościach liczebności włókien nerwowych GAL-IR (GAL90+) obserwowano statystycznie istotnie niższą wartość IFN $\gamma$  w surowicy krwi u chorych dzieci. W zakresie liczebności włókien nerwowych VIP-IR nie stwierdzono żadnych zależności z oznaczanymi cytokinami

## VII część wyników

Ocena wpływu na jelitowy układ nerwowy bakterii beztlenowych izolowanych z wycinków śluzówki jelita grubego dzieci chorych na UC

**Tab. 35. Zestawienie wyników hodowli bakteryjnych (przeprowadzonych w warunkach beztlenowych, z oceną zdolności syntezy siarkowodoru), pobranych z wycinków błony śluzowej jelita grubego w badanych grupach I i II (poniższa tabela znajduje się również w III części wyników)**

**Tab. 35. The anaerobic culture of sulphate-reducing bacteria (SRB+) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) in colon mucosa samples in group I and II**

Wynik badania mikrobiologicznego <i>Bacteriological research</i>	Ujemny <i>Negative</i> (n=11)	Szczepy bakterii <i>Bacterial strain</i> SRB- (n=16)	Szczepy bakterii <i>Bacterial strain</i> SRB+ (n=15)
Grupa I (n=33)	2 (6,06%)	16 (48,48%)	15 (45,45%)
Grupa II (n=9)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Jak już wcześniej podano, w grupie I u 2 chorych (6,1%) nie wyhodowano żadnych bakterii beztlenowych, a u 31 chorych (93,9%) uzyskano dodatni wynik hodowli mikrobiologicznej wycinków błony śluzowej kątnicy. Wśród tych pacjentów, u 15 osób (48,4%) wyhodowane bakterie posiadały zdolność do syntetyzowania siarkowodoru. W większości przypadków wyhodowane bakterie należały do rodzaju *Bacteroides* i *Clostridium*. W grupie II we wszystkich przypadkach wynik hodowli biopłatów był ujemny.

**Tab. 68. Zależność liczebności włókien nerwowych GAL-IR w wycinkach śluzówki jelita grubego w grupie I od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nieredukujących siarkę (SRB-)**

**Tab. 68. The numerical force of GAL-IR nerve fibres in colon mucosa depending on the anaerobic sulphate-reducing bacteria (SRB+) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) presence in colon in group I**

GAL-IR	Średnie <i>Mean</i>	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Ujemny <i>negative</i>	5,0	2	2,3	3,3	6,6	3,3	5,0	6,6
SRB-	3,9	16	2,2	1,3	9,9	2,2	3,5	5,3
SRB +	4,8	15	2,9	1,6	13,9	3,1	4,3	5,3
Ogółem <i>total</i>	4,4	33	2,5	1,3	13,9			

Nie stwierdzono zależności pomiędzy liczebnością włókien nerwowych GAL-IR a obecnością w jelicie beztlenowych bakterii SRB+ i SRB-

**Tab. 69. Zależność liczebności włókien nerwowych PACAP-IR w wycinkach śluzówki jelita grubego w grupie I od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nieredukujących siarkę (SRB-)**  
**Tab. 69. The numerical force of PACAP-IR nerve fibres in colon mucosa depending on the anaerobic sulphate-reducing bacteria (SRB +) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) presence in colon in group I**

PACAP -IR	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Ujemny Negative	6,8	2	3,9	4,0	10	4,0	6,8	9,6
SRB-	6,0	16	2,6	2,2	11	3,6	5,7	7,7
SRB +	8,3	15	5,2	3,0	21	4,1	6,7	9,8
Ogółem Total	7,1	33	4,1	2,2	21			

Nie stwierdzono zależności pomiędzy liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR a obecnością w jelicie beztlenowych bakterii SRB+ i SRB-.

**Tab. 70. Zależność liczebności włókien nerwowych VIP-IR w wycinkach śluzówki jelita grubego w grupie I od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nieredukujących siarkę (SRB-)**  
**Tab. 70. The numerical force of VIP-IR nerve fibres in colon mucosa depending on the anaerobic sulphate-reducing bacteria (SRB +) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) presence in colon in group I**

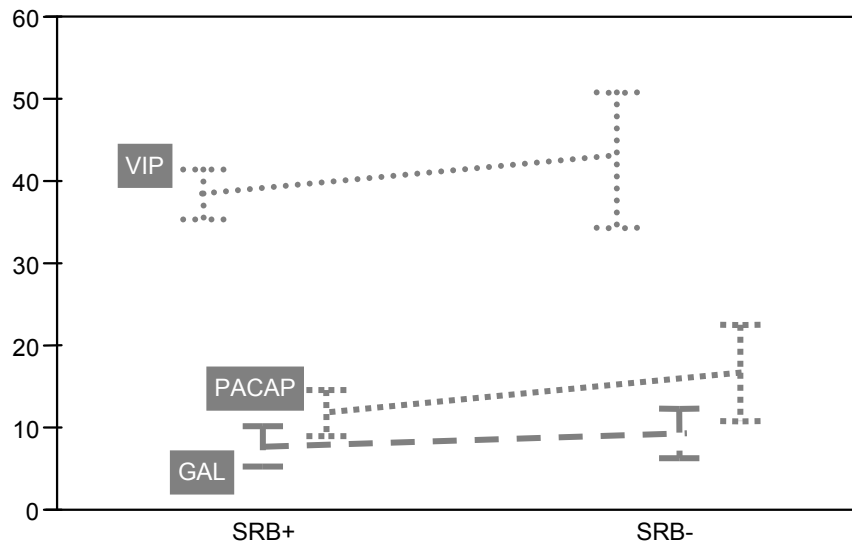
VIP -IR	Średnie Mean	N	SD	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Ujemny Negative	6,8	2	6,7	15	24	15	19	24
SRB-	6,0	16	2,8	15	24	17	19	21
SRB +	8,3	15	7,4	11	41	16	20	24
Ogółem Total	7,1	33	5,5	11	41			

Nie stwierdzono zależności pomiędzy liczebnością włókien nerwowych VIP-IR a obecnością w jelicie beztlenowych bakterii SRB+ i SRB-. Przystąpiono do oceny tej zależności w oparciu o częstości przekroczenia wartości mediany

**Tab. 71. Zależność liczebności włókien nerwowych VIP-IR w wycinkach śluzówki jelita grubego w grupie I od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nieredukujących siarki (SRB-)**  
**Tab. 71. The numerical force of VIP-IR nerve fibres in colon mucosa depending on the anaerobic sulphate-reducing bacteria (SRB +) and sulphate-reducing bacteria (SRB-) presence in colon in group I basing on the frequency of median's excess**

Hodowla beztlenowa biopłatów <i>Anaerobic bacteriological culture</i>		ujemny <i>negative</i>	SRB-	SRB+	ogółem <i>total</i>
VIP-	N	1	5	10	16
	%	6,25	31,25	62,50	
VIP+	N	1	11	5	17
	%	5,88	64,71	29,41	
Ogółem total	N	2	16	15	33

Stwierdzono, że osoby z obniżoną liczbą włókien nerwowych VIP – poniżej Q 50 mają częściej stwierdzoną obecność bakterii redukujących siarkę (SRB+), a osoby, u których liczba włókien nerwowych jest większa (z VIP+ powyżej Q 50), mają częściej stwierdzoną obecność bakterii nieredukujących siarkę (SRB-) (test  $\chi^2$ ;  $\chi^2[1]=3,9$ ;  $p<0,047$ ). U chorych, u których stwierdza się obecność w jelicie bakterii redukujących siarkę, w śluzówce jelita liczba włókien VIP-IR jest obniżona.



Ryc. 48. Zależność liczebności włókien nerwowych -IR: PACAP, VIP, GAL w wycinkach śluzówki jelita grubego w grupie I chorych (N=33) od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nie-redukujących siarkę (SRB-)

Fig. 48. The numerical force of PACAP, VIP, GAL-IR nerve fibres in colon mucosa samples in group I depending of the presence of anaerobic sulphate-reducing bacteria (SRB+) and/or sulphate-reducing bacteria (SRB-)

## 8. Dyskusja

Na podstawie dotychczas opublikowanych prac eksperymentalnych, genetycznych, tworzenia modeli zwierzęcych, analizy aspektów klinicznych, terapeutycznych w IBD, nie można w pełni ustalić zarówno pierwotnej przyczyny rozwoju tego schorzenia, jak i mechanizmów odpowiedzialnych za podtrzymywanie toczącego już się w tkankach procesu zapalnego.

Etiologia od dekad pozostaje nieznana, ale zbierane dowody sugerują, że zapalenie błony śluzowej jelit może być spowodowane defektami funkcji bariery śluzówkowej, co prowadzi do nadmiernej ekspozycji na obecne w świetle jelit antygeny i toksyny oraz niewłaściwą na nie odpowiedź immunologiczną [176].

Dowiedziano, że w przebiegu IBD zachodzą zmiany w ENS tak morfologiczne jak i funkcjonalne. Mogą być one zależne od czynników immunologicznych i bakteryjnych biorących pierwotnie udział procesie zapalnym toczącym się w jelicie [50, 51, 70, 102, 173, 217].

Prace analizujące rolę jelitowego układu nerwowego w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u ludzi są nieliczne, a wnioski w nich nie wyjaśniają ostatecznie wielu zagadnień [113, 115, 131, 222, 246].

Mimo znacznego wzrostu zachorowań na nieswoiste zapalenie jelit i faktu, że choroba ta ujawnia się nawet u najmłodszych dzieci, poszukiwane są nowe metody diagnostyczne, które pozwolą na wczesne postawienie rozpoznania i wdrożenie skutecznego, ukierunkowanego leczenia.

Podkreślane są trudności w tworzeniu modelu badań dotyczących IBD i otrzymywanych wyników, dotyczy to szczególnie dzieci, a wynika to głównie z heterogenności tych schorzeń [40]. w związku z tym stale pozostaje aktualne pytanie w jaki sposób w oparciu o poznane nowe czynniki etiopatogenetyczne można by rozszerzyć wytyczone standardy leczenia [213]. Rozważania wielu autorów dotyczące tego problemu stały się przyczynkiem do próby odpowiedzi na pytanie, czy jeszcze bardziej wnikliwa analiza powiązania ze sobą znanych już wcześniej czynników patogennych z ich ewentualnym wpływem na elementy struktury jelita jakim jest ENS, może mieć wpływ na przebieg nieswoistych zapaleń jelit.

Dotychczas brak jest epidemiologicznych danych dotyczących zapadalności na nieswoiste zapalenia jelit w populacji dziecięcej w Polsce. Jedynie wstępne badania prowadzone na materiale pochodzącym z 26 ośrodków pediatrycznych w Polsce w latach 2002-2004 wskazują, że w województwie pomorskim stwierdza się jedną z największych zapadalności na IBD u dzieci, z wyraźnym wzrostem zachorowań na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i nieokreślone nieswoiste zapalenie jelit [136]. W podobnych badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w ośrodku białostockim na materiale z lat 1990-2003 z terenu Podlasia, spostrzeżenia są podobne (material dotyczy ludzi dorosłych). Podobnie i tutaj stwierdza się przewagę zachorowań na UC [254].

W Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej AMG w latach 2002-2005 rozpoznano 77 nowych przypadków IBD. Ponadto pod stałą opieką przebywało w tym czasie 83 dzieci z IBD, w tym 61 z UC i 22 z CD w grupie wiekowej od 2,1 do 19,8 lat.

Obserwuje się na przestrzeni ostatnich lat coraz częściej nietypowy przebieg choroby, co przyczynia się do opóźnienia rozpoznania i wdrożenia leczenia [143].

W pierwszej części pracy analizie poddano ogólną charakterystykę chorych. Dane dotyczące grupy dzieci chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego wykazały brak różnic w zakresie płci (dziewczeta stanowiły 51,52%, chłopcy 48,48%). Potwierdza to dane z literatury o braku różnic płci w zapadalności na UC, szczególnie u dzieci [86, 101].

U dziewcząt w materiale badanym zaobserwowano gorszą odpowiedź na stosowane leczenie co doprowadziło do konieczności wykonania zabiegu pancolektomii. Trudno tę obserwację uogólniać, ponieważ przypadków było jedynie 7 (Tab. 4). Do niedawna wykonanie zabiegu usunięcia jelita grubego u dzieci było stosunkowo rzadko wykonywane. Dlatego spostrzeżenie to warte jest dalszej obserwacji.

Średnia wieku ogółem w badanych grupach wynosiła 13,7 lat (w zakresie od 3,0 do 19,0 lat), z tej grupy u dziewcząt 14,4 lat (w zakresie od 6,1 do lat 19,5), u chłopców 13,9 lat (w zakresie od 3,6 lat do 15,5 lat). Dziewczeta, u których wykonano zabieg chirurgiczny usunięcia jelita grubego były starsze od pozostałych dzieci chorych na UC. Ich wiek wynosił 15,2 lata (w zakresie od 13,4 lat do 20,8 lat). Jednocześnie były to pacjentki chorujące najdłużej, a kolektomii zostały poddane po wykorzystaniu wszystkich metod leczenia, które były u nich nie skuteczne (tabela 5, 6, 7).

Dane z literatury odnośnie wieku dzieci chorych na UC są zgodne z otrzymanymi wynikami, bowiem choroba rozpoczyna się w dzieciństwie w 25% przypadków, około 30% zachorowań przypada pomiędzy 11 a 15 rokiem życia, a w grupie młodzieży i młodych dorosłych, między 16 a 21 rokiem życia notowana jest większość zachorowań, nawet do 60% [25]. Z wywiadu zebranego od pacjentów wynika, że pierwsze objawy schorzenia, jakimi były najczęściej biegunka i stolce z domieszką krwi, są lekceważone i nie diagnozowane. Brak świadomości młodych ludzi, że są to objawy niepokojące, wydłuża znacznie czas postawienia właściwego rozpoznania. Z danych zawartych w niniejszej pracy wynika, że pacjenci zgłaszali się do lekarza średnio w około ½ roku od pojawienia się pierwszych dolegliwości.

W literaturze podnoszona jest rola, jaką odgrywa stan psychiczny pacjentów w okresach nawrotów, remisji, a nawet w powstawaniu nieswoistych procesów zapalnych w jelitach. Stres może zwiększać skłonność do zapalenia jelit, modulować jego stopień nasilenia poprzez oddziaływanie hormonów kory nadnerczy, autonomicznego układu nerwowego, jak również ENS [20, 135, 138].



Uwarunkowania rodzinne potwierdzają badania epidemiologiczne dotyczące częstości występowania zapalenia jelita grubego, jak również powtarzalność jednego typu schorzenia (UC albo CD) w jednej rodzinie. W wywiadzie w badanym materiale własnym stwierdzono takie uwarunkowanie w dwóch rodzinach (u ok. 5% w grupie dzieci chorych). Częstość ta jest zgodna z doniesieniami innych autorów [22, 101].

Obecnie obserwuje się coraz częściej nietypowy przebieg tej choroby. Chorzy zgłaszają się do Kliniki z rozpoznaniem przewlekłej biegunki, niedokrwistości, a nawet podejrzeniem choroby nowotworowej. Wynika to zapewne ze źle zbieranych wywiadów oraz długiego oczekiwania na wizytę u gastroenterologa. Odgrywają tu również rolę względy ekonomiczne i ograniczenie badań przez lekarzy rodzinnych.

Przystępując do analizy objawów choroby u chorych dzieci z UC należy stwierdzić, że biegunka znacząco dominowała w tej grupie i występowała u  $\frac{3}{4}$  badanych. U  $\frac{1}{4}$  chorych stwierdzano krew w stolcach, natomiast takie objawy jak bóle brzucha i gorączka stwierdzano jedynie u 15,15% badanych (ryc. 3) Obecność krwi w stolcach stwierdzano wykonując test na obecność krwi w kale, albo była ona widoczna makroskopowo od niewielkich ilości, aż do masywnego krwawienia. Opisane objawy są typowe dla UC i wymieniane w wielu publikacjach [14, 112, 213]. U wszystkich pacjentów z grupy porównawczej II (N=9) objawem wiodącym była obecność krwi w stolcach, z tego też powodu skierowani byli do diagnostyki endoskopowej (Tab. 8). W wykonanej kolonoskopii zmiany endoskopowe określano u nich jako lekkie, a w badaniu histopatologicznym wycinków śluzówki jelita zmian nie stwierdzono.

Aktywność choroby oceniano u dzieci na podstawie zmodyfikowanej skali punktowej (modyfikacja Ryzki i Wojnarowskiego skali Truelove-Wittsa) (Tab. 1) [213]. Stwierdzono, że w grupie I badanych chorych dominowali pacjenci z łagodną i umiarkowaną postacią choroby (93,9%), natomiast tylko u 2 chorych aktywność schorzenia oceniono jako postać ciężką UC (Tab. 9). W przypadkach ciężkiej postaci choroby istnieje wiele przeciwwskazań do wykonywania kolonoskopii ze względu na możliwość powikłań.

Podkreślić należy dużą przydatność tej zmodyfikowanej dla dzieci klasyfikacji, gdyż zawiera w sobie ocenę podstawowych objawów, badań laboratoryjnych, wskazuje na zaawansowanie choroby i istotnie pomaga w wyborze kierunku terapii.

Badania laboratoryjne wykonywane standardowo u pacjentów badanej grupy potwierdzały istnienie stanu zapalnego. U chorych stwierdzono podwyższenie uznanych wskaźników stanu zapalnego, a więc OB, CRP, oraz płytek krwi. Podwyższenie tych parametrów obserwowano u ponad połowy badanych. Pozostałe badania, takie jak poziom leukocytów we krwi obwodowej (z przesunięciem obrazu w lewo, poziom hemoglobiny, poziom

fibrynogenu, wykazywały nieprawidłowe wartości u dzieci chorych pomiędzy 36,4% do 42,4% (Tab. 10).

Stan odżywienia dzieci chorych na UC określano wykorzystując ogólnie przyjęty wskaźnik Cole'a. Wartości wskaźnika Cole'a wyrażone w procentach wahały się pomiędzy 85-90 a 90-110 i świadczyły o prawidłowym odżywieniu lub umiarkowanym niedożywieniu pacjentów. W tym przedziale mieściło się 97% badanych (Tab. 11). Wartości wskaźnika Cole'a mogły świadczyć o dość krótkim czasie trwania i zaawansowania choroby, a także prawidłowo prowadzonej realimentacji.

Doniesienia w literaturze podkreślają trudności oceny skuteczności stosowanych leków w IBD. O wyborze leczenia decyduje głównie stan kliniczny, obraz jelita w badaniu koloskopowym, wynik badania ultrasonograficznego jamy brzusznej. U większości chorych terapia jest zróżnicowana. Pacjenci znacznie różnią się stanem klinicznym, a leczenie rozpoczynamy w różnych stopniach aktywności choroby. Stąd też trudności wynikające z braku możliwości szerokich badań randomizowanych [40].

Przy wyborze leczenia konieczne jest również uwzględnienie tolerancji poszczególnych leków oraz drogi ich podania. Wspomnieć też należy z ubolewaniem, że lekarz gastroenterolog wybór leku ma niejednokrotnie ograniczony ze względów ekonomicznych tak w szpitalu, ale również przy kontynuacji leczenia w domu.

U badanych naszych pacjentów analiza stosowanej terapii wykazała, że prawie wszyscy chorzy w pierwszych 3 miesiącach leczenia otrzymywali preparaty 5-ASA, następnie od 5-7 miesiąca stosowana była ponadto sterydoterapia, a leczenie immunosupresyjne przeciętnie zastosowano powyżej 7 miesiąca trwania choroby. Leczenie immunosupresyjne dotyczyło 27,27%, a sterydoterapia 18,18% pacjentów. W tym dłuższym okresie leczenia stosowano zazwyczaj również poprzednie leki (Tab. 12) Większość chorych otrzymywała probiotyki (63,64%), metronidazol (30,30%), antybiotyki (18,18%). Rodzaj i czas stosowania poszczególnych leków nie odbiegał od ogólnie przyjętych schematów leczenia.

Aktywność zmian endoskopowych kwalifikowano opierając się na wskaźniku zmian endoskopowych (EI) wg Rachmilewitsza, (Tab. 2) w którym punktowano: granulację bł. śluzowej, rysunek naczyniowy, ranliwość bł. śluzowej i powierzchnię bł. śluzowej (śluz, ropa, owrzodzenia, nadżerki) i wg skali punktowej określono zmiany jako lekkie nasilenie, umiarkowane i znaczne nasilenie zmian [14, 213].

U dzieci chorych na UC liczba pacjentów w poszczególnych stopniach aktywności była podobna i wynosiła w stopniu aktywności lekkim 30,30%, umiarkowanym 36,36%, a w znacznym stopniu aktywności 33,33%. W grupie porównawczej II (N=9) zmiany w kolonoskopii były minimalne, z niewielką granulacją i wzmożoną krwawliwością i zostały zakwalifikowane jako lekkie (Tab. 13)

Celem weryfikacji rozpoznania wycinki śluzówki jelita poddano ocenie histopatologicznej (Tab. 14) Stopień zaawansowania zmian w obrazie histopatologicznym u dzieci chorych oceniano wg. 4 stopniowej skali Maiera [187].

Wykazano, że w grupie chorych od 1 do 4 stopnia w tej skali znajduje się przeciętnie 25% badanych. Z 9 dzieci o najwyższym stopniu zaawansowania zmian w obrazie histopatologicznym w późniejszym okresie musiało u 7 z nich wykonać kolektomię. Tak więc pierwotne, znaczne nasilenie zmian histopatologicznych może sugerować późniejszy, ciężki przebieg choroby. W grupie porównawczej nie stwierdzano zmian w obrazie mikroskopowym jelita (tab 11).

W drugiej części pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie jaka jest odpowiedź immunologiczna (miejscowa i ogólnoustrojowa), na toczący się w jelicie proces zapalny. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy nie zachodzi zaburzenie równowagi pomiędzy grupami:

1. cytokin prozapalnych: interferonu gamma ( $IFN\gamma$ ), interleukiny-1-beta ( $IL-1\beta$ ), interleukiny 8 ( $IL-8$ ) i czynnika martwicy nowotworów ( $TNF\alpha$ )
2. cytokiny przeciwzapalnej interleukiny-10 ( $IL-10$ )
3. cytokin immunostymulacyjnych: interleukiny 12 ( $IL-12$ ) i interleukiny 18 ( $IL-18$ ) w ścianie jelita grubego oraz w surowicy krwi dzieci chorych na UC.

Procesy zapalne w błonie śluzowej jelita mogą wynikać z pierwotnego defektu regulacji układu immunologicznego, a przyczyną stanu zapalnego jelit może być więcej niż jedno zaburzenie układu immunologicznego [130, 226, 260].

Rozwój odpowiedzi zapalnej w ścianie jelita następuje w wyniku aktywacji zarówno czynników uwalnianych lokalnie, jaki i wzrostu aktywności jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, limfocytów, monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Zjawisko chemotaksji ułatwia tym komórkom migrację do ogniska zapalnego [185].

Końcowy rezultat odpowiedzi immunologicznej w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit zależy jednak od zaburzeń dynamicznej równowagi pomiędzy aktywnością cytokin prozapalnych ( $IL-1$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ), przeciwzapalnych ( $IL-4$ ,  $IL-10$ ) oraz interleukin immunomodulacyjnych ( $IL-2$ ,  $IL-5$ ,  $IL-12$ ,  $IL-18$ ).

Wynikiem tego procesu jest rozwój zmian miejscowych w IBD. W licznych publikacjach podkreśla się rolę jaką w procesie zapalnym w jelicie, a szczególnie w przebiegu UC odgrywają cytokiny prozapalne  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-6$  i  $IL-8$ , [90, 171, 210]. Podwyższone stężenia cytokin w śluzówce doprowadza do produkcji przez fibroblasty znacznej ilości enzymów degenerujących jelito, co powoduje utratę integralności śluzówki oraz powstania owrzodzeń [155].

Współczesne metody biologii molekularnej, prowadzone również na modelach zwierzęcych pozwalają na ocenę ekspresji genów kilku cytokin w niewielkiej ilości materiału biopsyjnego [189, 205]. Umożliwia to porównanie występowania aktywnych postaci cytokin u tego samego osobnika zarówno

miejscowo (w obrębie śluzówki jelita) oraz w surowicy krwi będącej wykładnikiem zmian ogólnoustrojowych [260].

Niektóre doniesienia z literatury sugerują, że proces zapalny w IBD może wynikać z nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej na infekcję bliżej niezidentyfikowanym patogenem (bakterie beztlenowe?), co ma dotyczyć osobników predysponowanych genetycznie. Uznany jest fakt, że cytokiny odgrywają ważną funkcję w tym procesie [203].

W interesującej publikacji z 2000 roku Bueno podaje, że głównymi komórkami docelowymi podlegającymi wpływowi mediatorów pozapalnych są: komórki mięśni gładkich, komórki gleju i neurony. Wszystkie te 3 rodzaje komórek są integralnymi składowymi ścianą jelita. Zmiany w komórce mięśni gładkich pod wpływem mediatorów prozapalnych dotyczą głównie wytwarzania i uwalniania cytokin. W tym kontekście, cytokiny takie jak IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  mogą wpływać na powstawanie zaburzeń motoryki w jelicie. Dzieje się to poprzez modulację ENS [35].

Tak więc jest jeszcze nie wyjaśnione zagadnienie, która z wyżej wymienionych cytokin przejawia najsilniejsze działanie i którego stadium zapalenia dotyczy.

Z przeprowadzonych badań wynika, że poziom IL-1 $\beta$ , cytokiny prozapalnej i IL-10 cytokiny przeciwzapalnej we krwi, a IL-1 $\beta$  również w zmienionej śluzówce jelita grubego nie są znamienne statystycznie w porównaniu między grupą chorych, a grupą dzieci zdrowych. Wszystkie natomiast wartości pozostałych cytokin różniły się (znamienne statystycznie) w grupie dzieci chorych i zdrowych (Tab. 15, ryc. 4).

IL-1 $\beta$  i IL-10 to cytokiny o zupełnie innych zadaniach. IL-1 $\beta$  jest cytokiną prozapalną, co wydaje się mieć istotne znaczenie w patogenezie IBD. W literaturze opisywany jest jej podwyższony poziom w wycinkach śluzówki jelita w IBD [61, 245]. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy pogląd ten nie znalazł potwierdzenia. Być może dlatego, że poziom IL-1 $\beta$  u badanych pacjentów był określany po kilku miesiącach leczenia.

Poziomy stężenie tej cytokiny prozapalnej w surowicach chorych i grupy porównawczej były poniżej minimalnego poziomu wykrywalności zastosowanego testu ELISA, co wskazuje na miejscowe działanie IL-1 $\beta$  jedynie w śluzówce jelita.

Natomiast IL-10 jest cytokiną przeciwzapalną, (hamuje syntezę IL-12 i cytokin prozapalnych takich jak IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ ). Najnowsze dane wskazują, że IL-10 może odgrywać znaczącą rolę głównie w CD [47, 57, 142].

We własnym materiale poziom mRNA IL-10 w błonie śluzowej jelita wykazywał niewielki wzrost u dzieci chorych w porównaniu z grupą kontrolną, był on jednak znamienno statystycznie. W sytuacji wyraźnie podwyższonej ekspresji TNF $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (o czym poniżej) może to świadczyć o niewystarczającej, w tej grupie chorych, aktywacji odpowiedzi przeciwzapalnej.

Poziomy TNF $\alpha$ , IL-18, oraz IL-12 wykazują wyższą ekspresję w wycinkach błony śluzowej jelita (znamienną statystycznie) w grupie dzieci chorych na UC w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 5).

TNF $\alpha$  jest jedną z najważniejszych cytokin aktywujących proces zapalny. Bierze on ponadto udział w zjawisku apoptozy. Wzrost ekspresji TNF $\alpha$  jest jednym z czynników bezpośrednio zwiększających ryzyko wystąpienia IBD. Głównym bodźcem do wytwarzania TNF $\alpha$  są lipopolisacharydy ścian komórek bakteryjnych. W błonie śluzowej prawidłowego jelita TNF $\alpha$  występuje wyłącznie w nieznacznej liczbie komórek, podczas gdy w UC i w CD liczba komórek zawierających TNF $\alpha$  wyraźnie wzrasta [80, 130, 238].

Doniesienie Breese i wsp. dotyczy chorób zapalnych jelita grubego u dzieci i podkreśla zwiększoną aktywność komórek wydzielających TNF $\alpha$  w wycinkach śluzówki jelita u dzieci z UC i CD [29].

Badano również związek pomiędzy aktywnością choroby, a stężeniem TNF w surowicy u pacjentów z IBD. Poziom TNF $\alpha$  był 390 razy większy (380x w UC i 640x w CD); 1,7 razy wyższy w aktywnej fazie choroby w porównaniu do okresu remisji [132]. Tak więc cytokina ta, w świetle ostatnich badań, może być traktowana jako marker nasilenia procesu zapalnego w jelicie.

W badaniach własnych w sytuacji wyraźnie podwyższonej ekspresji TNF $\alpha$  i IFN- $\gamma$  może to świadczyć o niewystarczającej, w tej grupie chorych, aktywacji odpowiedzi przeciwzapalnej. Brak równowagi pomiędzy aktywnością cytokin o charakterze prozapalnym (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) i przeciwzapalnym (IL-10) może stanowić jeden z czynników, które prowadzą do rozwoju IBD.

IL-18 (interleukina immunostymulacyjna) zarówno w wycinkach błony śluzowej jelita i surowicy w grupie dzieci chorych wykazuje znamienne statystycznie wyższe wartości niż u dzieci zdrowych (ryc. 6). Wiadomo, że indukuje ona syntezę cytokin prozapalnych takich jak INF $\gamma$  oraz TNF $\alpha$ , które mają, jak już wyżej wspomniano, zasadnicze znaczenie w patogenezie IBD [170]. Chociaż IL-18 badano u ludzi chorych na IBD jak i na modelach zwierzęcych, nie udało się określić jednoznacznie jej funkcji w toku przewlekłych chorób zapalnych jelit. Wiercińska-Drapała i wsp. wykazali, że poziom IL-18 w śluzówce jelita u chorych na UC z najcięższą postacią, był 2 razy wyższy niż u osób zdrowych, a jej poziom w surowicy korelował z wynikami badań endoskopowych, indeksem aktywności choroby, oraz nasileniem stanu zapalnego. Nie były to wprawdzie znaczące różnice statystyczne, ale mogą według autorów być użytecznym markerem aktywności UC.

Tak więc precyzyjne określenie udziału IL-18 w patogenezie IBD wciąż jest tematem otwartym [73, 254].

Interleukina 12 (IL-12) należy również do grupy Interleukin immunostymulacyjnych. Pewne dane wskazują na znaczną rolę IL-12 w rozwoju IBD [169].

W przedstawionych badaniach własnych ekspresja IL-12 była wyższa w wycinkach błony śluzowej w grupie chorych z UC w porównaniu z grupą dzieci zdrowych. Natomiast stężenie IL-12 w surowicy krwi jest znacznie statystycznie wyższe w grupie dzieci chorych na UC w porównaniu z pacjentami z grupy porównawczej (ryc. 7). Znaczny wzrost jej stężenia w surowicy krwi u dzieci chorych na UC, mimo niewielkich zmian w miejscowej ekspresji IL-12 w tej grupie chorych, wskazuje na niewątpliwie pozajelitowe wytwarzanie tej cytokiny.

IL-8 to prozapalna cytokina, odgrywająca ważną rolę w przebiegu ostrej fazy zapalenia, nasila chemotaksję w stosunku do neutrofilów, granulocytów zasadochłonnych, kwasochłonnych oraz limfocytów T [80]. Najważniejsza jej funkcja to przyciąganie neutrofilów do miejsca zapalenia i pobudzenie ich do działania bakterioobójczego. Wykazano, że wydzielające enterotoksynę szczepy *Bacteroides* mogą odgrywać ważną rolę w procesie zapalnym jelit poprzez pobudzenie produkcji IL-8 [259].

W badaniach własnych stwierdzono podwyższoną ekspresję genu IL-8 w śluzówce jelita grubego, jednak w mniejszym stopniu niż ma to miejsce w przypadku jej poziomu w surowicy krwi. Stężenie IL-8 w surowicy krwi wykazuje statystycznie różnice pomiędzy grupami i jest w grupie chorych na UC wyższe w porównaniu z pacjentami z grupy porównawczej (ryc. 8).

Wyniki badań w niniejszej pracy świadczą, że IL-8 odgrywa rolę w generowaniu procesu zapalnego w śluzówce jelita, jak i poprzez wysoki jej poziom w surowicy podtrzymując proces zapalny [106].

Kolejna analiza materiału własnego dotyczyła zależności pomiędzy poziomem oznaczanych cytokin, a czasem trwania i aktywnością choroby.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem analizowanych cytokin a czasem trwania choroby. Szczegółowe przeprowadzenie analizy statystycznej pozwoliło jednak wykazać pewne zależności między czasem trwania choroby, a cytokinami prozapalnymi (Tab. 16-24, ryc. 8-12).

Stwierdzono, że poziom IL-8 w surowicy krwi oraz poziom ekspresji IFN $\gamma$  w śluzówce jelita jest podwyższony u dzieci chorych w porównaniu z grupą kontrolną i dotyczy pacjentów chorujących krótko (1 lub 2 miesiące). Pozostaje to w przeciwieństwie do niewielkiego tylko wzrostu poziomu IL-10 w błonie śluzowej jelita u dzieci chorych. Fakt podwyższenia poziomu cytokin prozapalnych z równoczesnym niewielkim wzrostem cytokiny przejawiającej funkcję przeciwzapalną, świadczyć może o zaburzeniu równowagi między nimi w początkowym okresie choroby. Może się to przyczyniać do wywoływania, a nawet podtrzymywania stanu zapalnego w jelicie.

Do syntezy immunostymulacyjnej IL-12, jak już wspomniano powyżej, są zdolne limfocyty obecne w blaszce właściwej jelita. W UC stwierdza się jej zwiększoną syntezę [177].

W badaniach własnych wykazano, że IL-12 u naszych pacjentów w pierwszym okresie trwania choroby była obniżona w surowicy krwi, nato-

miast w wycinku śluzówki zmienionego zapalnie jelita jej poziom był podwyższony i co przypuszczalnie stanowi początkową odpowiedź na proces zapalny w jelicie.

Nawiązując do poprzednich rozważań dotyczących poziomu IFN- $\gamma$  w zmienionej zapalnie śluzowce jelita, przy jednoczesnym wzroście IL-8 w surowicy u tych pacjentów, a obniżeniem w tym czasie IL-10 (działanie przeciwzapalne) świadczyć może o niewystarczającej aktywacji odpowiedzi przeciwzapalnej w początkowym okresie UC.

Analizując powyższe dane należy zadać pytanie co dzieje się w okresie, kiedy choroba trwa dłużej (3-4 miesiące). Wyraźnie wówczas stwierdza się wybiórczo bardzo wysoki poziom IL-18 oraz TNF $\alpha$  w surowicy. Być może, indukowane przez immunostymulacyjną IL-18 cytokiny prozapalne – iNF $\gamma$  oraz TNF $\alpha$ , mogą mieć zasadnicze znaczenie w nasileniu stanu zapalnego w jelicie [99, 170].

Analiza poziomów wyżej omawianych cytokin zarówno w surowicy jak i w śluzowce nie wykazała żadnej zależności od aktywności choroby (Tab. 25-33).

Przeprowadzając analizę poziomu cytokin tak w surowicy jak i w śluzowce jelita w zależności od wyhodowanej flory bakteryjnej (beztlenowej) nie otrzymano jednoznacznych wyników. Porównując średnie wartości wszystkich cytokin u tych pacjentów, u których nie wyhodowano bakterii beztlenowych, jak i u tych, u których wyhodowano szczepy SRB- i SRB+, nie stwierdzono znamienności statystycznej. Jedynie IL-10 (Tab. 34) wykazywała podwyższony poziom ekspresji u pacjentów, u których stwierdzono obecność bakterii beztlenowych, ale bez zdolności do redukcji siarki (SRB-).

W doniesieniach z literatury, które dotyczą badań eksperymentalnych stwierdzono, że u myszy z niedoborem IL-10, hodowanych w normalnych warunkach, dochodzi do przewlekłego zapalenia jelit. Charakterystyczny jest w tym modelu intensywny rozrost regeneracyjny śluzówki prowadzący do pogrubienia ściany jelita, niewłaściwa budowa krypt i kosmków, znaczny naciek limfocytów, plazmocytów i histiocytów w blaszce właściwej i warstwie podśluzowej [101, 225, 237, 238].

Na podstawie badania, w przedstawionym materiale hodowli z wycinków śluzówki jelita zmienionego zapalnie można przypuszczać, że wzrost IL-10 w śluzowce jelita jest prawdopodobnie odpowiedzią miejscową organizmu zmierzającą do ograniczenia stanu zapalnego. Wydaje się, że dalsze badania dotyczące etiopatogenezy IBD muszą skupić się na problemie jak system immunologiczny odpowiada na potencjalne patogeny w świetle jelita w stanie przewlekłego procesu zapalnego.

Tak więc, informacje uzyskane z oceny udziału cytokin w rozwoju zmian chorobowych u pacjentów z IBD na poziomie tkankowym (śluzowka jelita) i ogólnoustrojowym przyczynić się mogą do lepszego zro-

zumienia procesu generowania i wygaszania procesu zapalnego w jelicie. Stać się mogą przyczynkiem do lepszego poznania etiopatogenezy IBD.

W trzeciej części pracy ocenie poddano skład flory jelitowej dzieci chorych na UC ze szczególnym uwzględnieniem obecności szczepów bez-tlenowych.

Pierwszą komórkową barierą przewodu pokarmowego zapobiegającą stymulowaniu układu immunologicznego jest warstwa nabłonka jelitowego. Jak wiadomo, każda komórka nabłonka utrzymuje bezpośrednie powiązanie z komórką sąsiednią i zamyka powierzchnię przewodu szczelnymi połączeniami. O ile w górnym odcinku jelita, antygeny pochodzą z substancji pokarmowych, o tyle w jelicie grubym dodatkowym antygenem mogą być składniki komensalnej flory jelitowej. Nabłonkowa bariera jelitowa nie w pełni jednak zapobiega penetracji antygenów. Mogą one przedostawać się między innymi poprzez przerwy w ścisłych połączeniach, prawdopodobnie na szczytach kosmków jelitowych. Wiadomo, że normalna flora komensalna ma właściwości przeciwwzapalne i ochronne. W niektórych jednak sytuacjach może przejawiać działanie patogenne [88, 157, 219].

Wiadomo, że w toku stwierdzanego procesu zapalnego w jelicie dochodzi do zjawiska dysbiozy. Nie ustalono jednak ściśle, kiedy ona powstaje: czy leży u podłoża powstawania procesu zapalnego, czy też rozwija się później, w czasie jej trwania. Dane uzyskane z badań nad zwierzętami sugerują, że fenotyp immunologiczny gospodarza może silnie wpływać na skład mikroflory jelita. W doniesieniach sugerowano, że profil bakterii jest stały w ciągu życia, ale obecna dieta, nowoczesne żywienie niemowląt, w tym rezygnacja z karmienia piersią, stosowanie antybiotyków mogą faworyzować wzrost agresywnych grup bakterii kosztem korzystnych grup komensali [241].

Powstający stan dysbiozy wpływa ewidentnie na zmianę strukturalnych barier śluzówki, zwiększa sekrecję płynów i elektrolitów (objawy biegunki) [18].

Współczesne teorie sugerują, że u podstawy powstawania kaskady zapalenia w jelicie mogą leżeć predyspozycje genetyczne, dysregulacja immunologiczna oraz obecność niektórych patogennych mikroorganizmów [184, 236, 250].

W literaturze światowej podkreśla się, że u pacjentów z IBD nasilenie stanu zapalnego stwierdza się w odcinkach jelita zawierających największe stężenie bakterii. Odcinek terminalny, kątnica, odbytnica są miejscami, gdzie zawartość światła jelita pozostaje najdłużej w kontakcie ze śluzówką [149].

Pierwotne uszkodzenie błony śluzowej może spowodować spadek tolerancji nawet na prawidłową florę jelitową. Tu może się przejawiać wpływ układu immunologicznego [192].

Jak dotąd nie wskazano na specyficzne mikroorganizmy związane z patogenezą IBD. Analiza mikroflory jelita chorych na UC pokazuje różnice w składzie flory jelitowej w porównaniu z osobnikami zdrowymi. Obecnie podejście terapeutyczne w tych stanach zapalnych jelit skierowa-



ne jest na poprawę funkcji bariery śluzówkowej. Zastosowanie tu mają diety elementarne, żywienie pozajelitowe, antybiotykoterapia i zastosowanie probiotyków [2].

W ciągu minionych kilku lat zastosowanie probiotyków w IBD i innych zaburzeniach jelitowych skupiło na sobie uwagę wielu ośrodków badawczych. Wpływ na bakterie jelitowe za pomocą antybiotyków i probiotyków może być bardzo efektywne i ograniczyć leczenie agresywne jakim jest immunosupresja.

Szersza analiza flory bakteryjnej związanej z IBD wskazuje na beztlenowce z rodzaju *Bacteroides* czy *Clostridium* [101]. Wśród rodzaju *Bacteroides* szczep *Bacteroides fragilis* stanowi składnik fizjologicznej flory jelitowej. W niektórych jednak przypadkach, mogą namnażać się w jelicie jego enterotoksyczne szczepy i powodować nasiloną biegunkę [117, 149].

Ze względu na wyżej opisane właściwości od lat 90. szczepy enterotoksycznotwórcze uważa się ewidentnie entropatogenne dla człowieka [206].

Bakterie beztlenowe mogą wywoływać każdy typ zakażenia bakteryjnego u człowieka i dotyczyć może wszystkich narządów i tkanek [36].

Istnieje wiele zakażeń, w których beztlenowce, szczególnie z rodzaju *Bacteroides*, należą do dominujących czynników chorobotwórczych lub przynajmniej są w nich obecne. Diagnostyka bakterii beztlenowych wymaga specjalistycznych metod hodowli, jest dość kosztowna i dlatego też w wielu ośrodkach jest nie stosowana rutynowo w diagnostyce, co jest błędne [207].

Ważną rolę w etiopatogenezie UC przypisuje się bakteriom redukującym siarczany (*sulphate-reducing bacteria* – SRB), a zwłaszcza wytwarzanemu przez nie siarkowodorowi. Udowodniono, że w przypadkach dynamicznego rozwoju bakterii siarkowych może dochodzić do zużycia siarki tworzącej mostki w strukturze cząsteczki śluzu jelitowego – mucyny. Funkcja n-maślanu w obrębie kolonocyta pełni rolę ochronną w Obrębie śluzówki i może być selektywnie hamowana poprzez siarkowodor. Wpływ na produkcję nieprawidłowego śluzu jelitowego z jednoczesnym wytwarzaniem toksycznego dla nabłonka jelitowego siarkowodoru czyni z bakterii siarkowych istotny czynnik w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit. [119].

W doniesieniu Pitchera i wsp. wykazano, że u pacjentów z aktywnym UC stwierdza się nosicielstwo bakterii redukujących siarkę (SRB+) i obecność tych szczepów była wyraźnie związana ze stopniem aktywności klinicznej schorzenia [6, 118, 191].

W badaniach bakteriologicznych w niniejszej pracy wykonywano posiewy kału oraz hodowlę wycinków śluzówki jelita grubego (głównie z kątnicy) w kierunku bakterii beztlenowych. Wyżej wymienione badania przeprowadzono zarówno u dzieci chorych i w grupie porównawczej. W przeważającej liczbie (31 chorych) u pacjentów z UC, poza 2 chorymi, wyhodowano bakterie beztlenowe, wśród których dominowały bakterie z rodzaju *Bacteroides* i były to głównie szczepy *Bacteroides fragilis*, oraz *Clostridium species*. Z tej grupy cho-

rych dzieci u 15 pacjentów stwierdzono obecność bakterii redukujących siarkę (SRB+). Bakterii SRB+ opisywane są w literaturze jako szczepy dominujące, szczególnie u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Dotyczy to ponad 80% pacjentów i wydaje się, że ich obecność jest charakterystyczna dla tego schorzenia [62, 119].

U pozostałych badanych dzieci wyniki hodowli w kierunku szczepów redukujących siarkę były ujemne. W grupie porównawczej hodowle biopłatów były ujemne (Tab. 35). U wszystkich pacjentów przeprowadzono ponadto badanie parazytologiczne i mikrobiologiczne kału, które obejmowało rutynową ocenę flory bakteryjnej ze szczególnym uwzględnieniem *Salmonelli*, *Shigelli*, *Yersinii*, *Campylobacter* oraz enteropatogennych i enterokrwotocznych szczepów *E. coli*. U wszystkich badanych dzieci badania w kierunku wyżej wymienionych bakterii i parazytów były ujemne.

Oceniając zależności pomiędzy wynikami hodowli beztlenowej wycinków, a aktywnością choroby nie stwierdzono znamienych różnic u chorych z różnymi postaciami aktywności choroby.

Można jednak zauważyć, że w przypadkach dodatniej hodowli, w której stwierdzono bakterie redukujące siarkę, dominowali chorzy z umiarkowaną i ciężką postacią choroby, przy hodowli bakterii SRB – było więcej chorych z postacią łagodną i umiarkowaną. Nie były jednak to wartości znamienne statystycznie (Tab. 36).

Wyniki badań bakteriologicznych potwierdzających udział beztlenowej flory jelitowej w procesie zapalnym jelit powinny inspirować do stosowania tych badań jako rutynowe w trakcie koloskopii u wszystkich pacjentów z podejrzeniem UC, ale również w trakcie stosowanego leczenia.

Należy zaznaczyć, że procedura dotycząca bakterii *Bacteroides* czy też *Clostridium* w kierunku określenia szczepów enterotoksynotwórczych jest skomplikowana i niedostępna dla rutynowej diagnostyki w wielu ośrodkach. Wydaje się, że konieczne jest udoskonalenie diagnostyki bakteriologicznej w schorzeniach jelit, w tym możliwość określenia enterotoksyczności hodowanych bakterii, a głównie dominującego w ponad 90% enterotoksynotwórczego szczepu *Bacteroides fragilis* (ETBF) [206].

W czwartej części pracy oceniano ilości włókien nerwowych zaopatrujących warstwę błony śluzowej w wycinkach śluzówki jelita grubego u pacjentów z UC w różnych stadiach i stopniach zaawansowania schorzenia, z uwzględnieniem stosowanej terapii

Jak wiadomo, jelitowy układ nerwowy bierze udział w większości fizjologicznych i patofizjologicznych procesów w przewodzie pokarmowym. ENS reguluje czynności żołądkowo-jelitowe, perystaltykę, wydzielanie, sekrecję, przepływ krwi oraz układ immunologiczny [49, 94, 96, 240].

Badania przeprowadzone w ostatnich kilku latach dostarczyły niepodważalnych dowodów co do udziału neuropeptydów (substancji trans-

misyjnych komórek nerwowych) w powstawaniu, rozwoju i zejściu szeregu procesów patologicznych [84].

W piśmiennictwie spotyka się wiele prac analizujących rolę, jaką pełnią neurotransmitery w kontroli funkcji jelita w stanie zdrowia i choroby. Większość tych doniesień dotyczy eksperymentów na zwierzętach, a uzyskane wyniki pozwalają silnie akcentować rolę neurotransmiterów o właściwościach protekcyjnych jakimi są między innymi VIP, PACAP i GAL [30, 89, 234].

Badania dotyczące roli jelitowego układu nerwowego (ENS) u ludzi napotykać na zrozumiałe trudności związane z pozyskaniem materiału badawczego i z tego powodu istnieje niewiele publikacji na ten temat [65, 115, 222, 230].

Wyniki badań liczebności włókien-IR neurotransmiterów w niniejszej pracy przedstawiają się następująco: stwierdzono, że zachodzi różnica w liczebności włókien immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL w obu grupach (chorych i zdrowych). Ilość włókien nerwowych w grupie dzieci z UC jest silnie statystycznie obniżona w stosunku do grupy porównawczej (Tab. 37-39, ryc. 13-16).

Można sądzić, że ta znamienna różnica wynika prawdopodobnie z toczonego się w jelicie procesu zapalnego i ciągłej odpowiedzi immunologicznej na patogen jakim jest wykazana u większości badanych (94%) bakteria beztlenowa. Takie zależności przedstawiają również inni badacze w swoich doniesieniach [54, 83, 165, 217, 262].

Liczebności włókien immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL są ze sobą związane dość znacznie, chociaż trudno ustalić statystycznie tę zależność (ryc. 17-19). Wydaje się, że wynika to z neuroprotekcyjnej funkcji jaką pełnią te trzy neurotransmitery wspólnie w przewodzie pokarmowym [8, 41, 63, 109].

Oceniano zależność liczebności włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL z aktywnością choroby u dzieci z UC. Nie obserwowano statystycznie znaczących zmian w liczbie włókien w różnych stopniach aktywności choroby u badanych pacjentów (Tab. 40). Wynika to zapewne z krótkiego okresu obserwacji oraz u większości z nich umiarkowanego stopnia aktywności schorzenia.

Biegunka, zaburzenia motoryki były u naszych pacjentów głównymi objawami klinicznymi wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Należy zadać pytanie jaka jest zależność pomiędzy badanymi neurotransmiterami, a najczęstszym objawem występującym u chorych z UC, a mianowicie biegunką i czy biegunka w tej chorobie wiąże się z liczebnością włókien GAL-IR, PACAP-IR, VIP-IR.

Synteza neuropeptydów ma miejsce w komórkach nerwowych jelita, immunologicznych oraz tkanki limfatycznej związanej z jelitem. Limfocyty, makrofagi, mastocyty, komórki epitelialne zdolne są do odpowiedzi na te neuropeptydy. Te ostatnie stymulują lub hamują wzrost limfocytów śluzówki i nabłonka jelita, wpływają na produkcję cytokin, kontrolują sekrecję wody i elektrolitów [75, 256].

Większość procesów, prowadzących do biegunki sekrecyjnej obejmuje aktywację jelitowego układu nerwowego, z lokalnym uwolnieniem neurotransmiterów, głównie GAL, które mają wpływ na motorykę jelita i sekrecję chlorków [116, 266].

Galanina (GAL), która jest neurotransmiterem ENS, w warunkach prawidłowych zaangażowana jest w regulację motoryki jelit poprzez oddziaływanie jej podtypu GAL-R1, zlokalizowanej w błonie komórek mięśni gładkich. Wykazano w badaniach na zwierzętach, że zapalenie ściany jelita, wywołane eksperymentalnie podawaniem siarczanu dekstranu sodu (DSS – dextran sodium sulfate), jest związane z nasileniem ekspresji GAL-R1, co powoduje zwiększoną sekrecją jonów Cl<sup>-</sup> w nabłonku okrężnicy. Galanina działa jako czynnik pobudzający wydzielanie w komórkach nabłonka wyścielającego ludzką okrężnicę, zmieniając ekspresję Gall-R i prawdopodobnie odgrywa ważną funkcję w biegunkach związanych z procesami zapalnymi w przewodzie pokarmowym. Mechanizmu tego procesu nie udało się jednak ostatecznie określić [17, 160, 208, 252].

Kolejny neurotransmiter – VIP – odgrywa istotną rolę w procesie neuroprotekcji, a także w reakcjach antyzapalnych. Na terenie jelita stwierdzono, że niektóre neurony VIP-ergiczne zwojów podśluzówkowych, wysyłają swoje aksony do zwojów mięśniówkowych, co może stanowić funkcjonalną podstawę związku, pomiędzy wydzielaniem, a motoryką. Główne jednak działanie tego transmittera opiera się na hamowaniu ekspresji cytokin prozapalnych, oraz wzmoczeniu syntezy i uwalniania cytokin przeciwzapalnych [175]. Tym samym nie można się spodziewać jego bezpośredniego wpływu na występujące u chorych objawy biegunki.

Wykazano, że w komórkach ENS, PACAP niemal zawsze współwystępuje z VIP.

Podobnie jak VIP, PACAP pełni różnorodne funkcje, modulując nie tylko działanie centralnego jak i obwodowego układu nerwowego lecz także ma wpływ na układ immunologiczny, poprzez produkcję wielu cytokin [41, 122]. Analizowano funkcje PACAP w regulacji motoryki mięśni gładkich, jego udział w kontroli odruchów do okrężnicy, a także znaczenie w fizjologii motoneuronów [67, 215].

W pracy własnej nie stwierdzono różnic w liczebności włókien immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL w zależności od częstości oddawanych stolców (Tab. 41, ryc. 20). Przeprowadzając bardziej szczegółową analizę statystyczną wykazano jednak ewidentnie zwiększenie liczebności włókien nerwowych PACAP-IR i GAL-IR u chorych, którzy mieli biegunkę, (Tab. 42-46). Obserwacja ta może przyczynić się do wyjaśnienia kolejnego mechanizmu patogenetycznego biegunki w niektórych procesach zapalnych toczących się na terenie jelita grubego.

Następnie analizie poddano zależność czasu trwania choroby i liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GA-IR u osób chorych (Tab. 47, ryc. 21)

Ze względu na niewielkie liczebności w grupach nie można wskazać na zależności statystyczne między czasem trwania choroby, a średnimi wartościami liczebności włókien immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL. Niemniej jednak szczegółowa analiza statystyczna pozwoliła ustalić słabą zależność związaną jedynie z liczbą włókien GAL-IR. Obserwacja w dłuższym czasie trwania choroby (3 lub więcej miesięcy) stwierdza obniżenie liczebności włókien GAL-IR (Tab. 48, ryc. 22).

W badaniach na modelach zwierzęcych, przeprowadzano analizę zależności czasu trwania stanu zapalnego w jelitach i liczebności neuronów zawierających neurotransmitery protekcyjne wykazano znaczne obniżanie się ich liczby w obrębie ENS w krótkim czasie od wywołania stanu zapalnego. Wiadomo również, że po ostrych, natychmiastowych reakcjach neuroimmunologicznych często występują długotrwałe zmiany na komórkach efektorowych jakimi są w tym przypadku komórki mięśniówki gładkiej i neurony enteryczne, które mogą mieć wpływ na syntezę niektórych cytokin [217].

Podkreśla się również, że różnice w poziomie neurotransmiterów mogą wynikać z różnych okresów trwania choroby, jej aktywności, stanu progresji, regresji oraz innych możliwych współistniejących schorzeń. Wiadomo również, że w zachodzącym w jelicie procesie zapalnym może równolegle zachodzić nekroza aksonalna, ale również aksonalna hiperplazja dotycząca części włókien nerwowych ENS [217].

Pomimo, że w niniejszym materiale badawczym mamy do czynienia z pacjentami u których czas trwania choroby jest różny, różna jest także aktywność schorzenia, wieloraka terapia, to istotnym spostrzeżeniem jest zaznaczona wyraźna odpowiedź ENS na toczący się proces zapalny w jelicie grubym. Co dzieje się z neurotransmiterami których działanie jest z założenia antyzapalne i protekcyjne? Czy proces degeneracyjny rozwija się powoli, a może patogen, który mógł wywołać zmiany w jelicie trafił już na śluzówkę pozbawioną homeostatycznych obronnych działań cytokin przeciwzapalnych i protekcyjnych transmiterów? Odpowiedź na te pytania może przynieść kontynuacja badań u ludzi chorujących na nieswoiste zapalenie jelit.

Ocena zależności liczebności włókien PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR od stosowanej terapii u osób chorych jest trudna ze względu na wielolekową terapię stosowaną u większości pacjentów.

Analizie poddano 32 pacjentów. Jeden pacjent w czasie włączenia do badań nie otrzymywał żadnych leków. Analizując zależność liczebności włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL od stosowania kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA), sterydów i innych preparatów immunosupresyjnych (głównie azathiopryny), nie otrzymano żadnych istotnych statystycznie wyników (Tab. 49-51). Wydaje się jednak słuszne przeanalizować ten temat bardziej szczegółowo.

Wiadomo, że kwas 5-aminosalicylowy (5-ASA) wykazuje działanie bakteriostatyczne, przeciwzapalne i immunosupresyjne poprzez: hamowanie syntezy

leukotrienów, prostaglandyn i cytokin. Hamuje także migrację komórek zapalnych i wytwarzanie immunoglobulin przez limfocyty B. Wpływa na upośledzenie adhezji i funkcji neutrofilii i makrofagów oraz na zmiatanie wolnych rodników tlenowych. U chorych w materiale własnym sulfasalazynę lub mesalazynę podawano jako rozpoczęcie terapii w łagodnym i umiarkowanym rzucie UC, a także w leczeniu podtrzymującym remisję, co zgodne jest z wytycznymi zawartymi w standardach leczenia IBD.

Z badań Pitchera i wsp. wiadomo, że *in vitro* kwas 5-ASA hamuje produkcję siarczanów w stopniu zależnym od dawki; u pacjentów z UC nie otrzymujących tego leku poziom siarczanu w stolcach był wyraźnie wyższy, niż w grupie kontrolnej [191]. Źródła produkcji siarkowodoru istniejące w obrębie światła okrężnicy, mogą być hamowane przez kwas 5-ASA. W przypadku UC ten mechanizm działania ma istotne znaczenie wobec faktu występowania w tej chorobie w jelicie bakterii redukujących siarkę.

Przy stosowaniu preparatów zawierających kwas 5-ASA stwierdzono u badanych dzieci podwyższenie liczebności włókien nerwowych PACAP-IR i VIP-IR, a liczba włókien GAL-IR była obniżona. Wydaje się możliwe, że kwas 5-ASA działając bakteriostatycznie, przeciwzapalnie i immunosupresyjnie wspomaga przeciwzapalne właściwości PACAP-IR i VIP-IR.

Cytoplazmatyczne receptory dla glikokortykosteroidów znajdują się niemal we wszystkich komórkach organizmu, również w komórkach układu odpornościowego. Glikokortykosteroidy hamują syntezę wielu cytokin: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF, ponadto blokują indukowaną formę tlenku azotu (iNOS). Populacją szczególnie wrażliwą na działanie glikokortykosteroidów są monocyty i makrofagi. Już przy niewielkich dawkach dochodzi do zahamowania chemotaksji, fagocytozy i zdolności bakteriobójczych makrofagów. Ze względu na dane sugerujące bezpośrednie zaangażowanie mechanizmów immunologicznych w utracie neuronów, badano czy leczenie przeciwzapalne UC mogło by wpłynąć na rozmiar uszkodzenia w obrębie jelitowego układu nerwowego w modelowym colitis. Otóż stwierdzono, że budesonid powodował zależną od dawki prewencję utraty neuronów w splocie myenterycznym u szczurów, którym podano ten steryd [217].

W badaniach własnych nie stwierdza się zależności liczebności włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL, a stosowaniem preparatów sterydowych.

Azathiopryna, pochodna 6-merkaptopuryny, jest jednym z pierwszych leków immunosupresyjnych stosowanych w terapii wielu schorzeń u człowieka. Hamuje ona czynność limfocytów T, w mniejszym stopniu także limfocytów B.

W szczegółowej analizie statystycznej można zauważyć, że w trakcie leczenia immunosupresyjnego liczebność włókien nerwowych PACAP-IR i VIP-IR jest obniżona, a liczebność włókien nerwowych GAL-IR jest podwyższona. Odwrotnie ma to miejsce w przypadku sterydoterapii.

Na ten fakt trudno obecnie znaleźć wytłumaczenie.

U osób, które otrzymywały probiotyk, stwierdza się zwiększoną liczebność włókien nerwowych GAL-IR. Natomiast u pacjentów nie otrzymujących probiotyku, takiej zależności nie stwierdza się.

Probiotyki były stosowane u większości badanych pacjentów z UC (63,64%) Wskazaniem do ich stosowania poza wspomaganie flory jelitowej przy stosowanych antybiotykach, było zagwarantowanie regeneracji i przywrócenia rozwoju prawidłowej flory jelitowej oraz zapobieganie osiedlaniu się i rozwojowi drobnoustrojów chorobotwórczych. Starannie dobrany skład bakterii w probiotykach, kolonizuje i rozmnaża się w jelicie cienkim i grubym stwarzając warunki do rozwoju *Bifidobacterium bifidum*. Korzystny mechanizm działania probiotyków, polega między innymi na konkurencyjnej walce z patogenami o adhezyjne receptory jelitowe i składniki odżywcze. Wspomagają również procesy immunostymulacji odporności humoralnej i układ makrofagów w śluzówce jelita. Probiotyki mają wpływ na harmonizację funkcji limfocytów Th1, Th2 i syntezy licznych cytokin [237]. Badano wpływ suplementacji pokarmów *S. boulardi* na obecność i wzorce markerów neuronalnych w neuronach mięśniówki jelita świni. Wyniki badań wskazują, że suplementacja diety liofilizowanymi szczepami bakterii zawartymi w probiotykach prezentuje terapeutyczne działanie oraz zmienia neurochemię w neuronach jelita [53, 120, 139].

U osób, które otrzymywały probiotyk, stwierdza się zwiększoną liczebność włókien nerwowych GAL-IR i PACAP-IR (Tab. 52, 53). Nie stwierdza się zależności pomiędzy przyjmowaniem probiotyku, a liczbą włókien nerwowych VIP-IR. Trudno jednak odpowiedzieć na pytanie na ile stosowany w terapii probiotyk mógł mieć wpływ na pobudzenie aktywności GAL-IR i PACAP-IR, transmitterów o właściwościach neuroprotektoryjnych i antyzapalnych.

W piątej części pracy ocenie poddano liczebności włókien immunoreaktywnych w śluzówce i mięśniówce jelita grubego oraz komórek pozytywnych VIP, PACAP i GAL w zwojach ściany jelita u chorych na UC opornych na leczenie, u których wykonano zabieg kolektomii (grupa Ia=7).

Jedną z metod leczenia UC jest postępowanie chirurgiczne. Decyzja o konieczności wykonania pan/proktokolektomii u dzieci i młodzieży jest niebywale trudna, tak ze strony lekarza, jak również rodziców czy też samego pacjenta. Problem ten podnoszony jest przez gastroenterologów coraz częściej, ale do chwili obecnej nie ma jednolitego stanowiska wielu grup roboczych opracowujących standardy dotyczące postępowania w nieswoistych zapaleniach jelit. Zdania są podzielone głównie pomiędzy pediatrami, a chirurgiem [187, 214].

Czy potrafimy odpowiedzieć na pytanie w jakim okresie choroby (pomijając wskazania nagłe), taką decyzję o konieczności kolektomii musimy podjąć. Jak przekonać chorego i jego rodzinę, że stosując leczenie zach-

wawcze nie jesteśmy w stanie opanować procesu zapalnego, a stosowana terapia, niejednokrotnie agresywna i przynosząca szczególnie u dzieci i młodzieży nieodwracalne skutki uboczne, nie przynosi i prawdopodobnie nie przyniesie długotrwałej remisji. Może poszerzenie procesu diagnostycznego o analizowane w niniejszej pracy badania jelitowego układu nerwowego u pacjentów lekoopornych przybliży w jakimś stopniu odpowiedzi na te pytania?

Ostatnie dowody wskazują, że zwoje jelitowe są aktywnie zaangażowane w kontrolę wielu funkcji układu pokarmowego i w różne procesy chorobowe tego układu. Zawierają one prekursory neurotransmiterów, mają właściwości ekspresji receptorów dla neurotransmiterów, co sprawia, że są dobrze dostosowane do roli intermediatorów w neurotransmisji jelitowej i przesyłaniu informacji w ENS. Nowe badania sugerują, że zwoje jelitowe grają ważną rolę w utrzymywaniu intergalności bariery śluzówkowej jelita. Łączą one także działanie układu nerwowego i odpornościowego w jelicie, gdyż mają potencjał do syntezy cytokin, prezentacji antygenów oraz odpowiedzi na czynniki zapalne. Zwoje jelitowe mają zdolność pełnienia swojej funkcji, nawet wobec braku wpływów z OUN [78].

Wiedza dotycząca cech morfologicznych i neurochemicznego kodowania neuronów śródściennych zwojów jelitowych jest stosunkowo obszerna, ale dotyczy wyłącznie badań na zwierzętach, głównie u świni. W przeprowadzonych badaniach autorzy wykazali, iż zawartość niektórych neuropeptydów w ścianie jelita grubego, będącego w stanie zapalnym, bądź też w neuronach pozajelitowych zaopatrujących te odcinki przewodu pokarmowego ulega w tym procesie zasadniczym i znaczącym zmianom. Jest powszechnie znane, że włókna nerwowe GAL, VIP, PACAP są obecne w przewodzie pokarmowym ssaków, gdzie są neurotransmiterami kontrolującymi sekrecyjne i motoryczne odruchy w obrębie jelita. Wykazano również, że większość zakończeń nerwowych obecnych w śluzówce jest pochodzenia wewnętrznego, gdyż neurony zlokalizowane są głównie w wewnętrznym i zewnętrznym splocie podśluzówkowym. [84, 220].

Role zwojów jelitowych w chorobach u ludzi nie była jeszcze szerzej badana, ale opierając się o dostępne dane możliwe jest przypuszczenie, że są one zaangażowane w etiopatogenezę różnych procesów patologicznych w jelicie, zwłaszcza z komponentą neurozapalną czy neurodegeneracyjną [209].

Jednakże nasza wiedza na temat ich adaptacyjnych zdolności podczas procesów zapalnych, szczególnie u człowieka jest dość ograniczona.

Dlatego też, założeniem badania była próba wykazania zmian unerwienia śluzówkowego i obecności neuronów zawierających transmittery GAL, VIP, PACAP w zwojach ściany jelita podczas nieswoistego procesu zapalnego w jelicie u człowieka.



Wskazaniami do usunięcia jelita grubego u naszych pacjentów była całkowita oporność na leczenie ze stałym pogarszaniem i utrzymywaniem się ewidentnego złego stanu zdrowia chorych.

W grupie 7 chorych u których wykonano zabieg kolektomii leczenie trwało od 6 do 19 miesięcy (średnio 12 mies. od rozpoczęcia leczenia). W tym czasie notowano kilka zaostrzeń choroby. Stosowane leczenie farmakologiczne, w tym kwas 5-ASA, sterydy, azathiopryna i wielokrotnie antybiotykoterapia nie przynosiły zamierzonych efektów. Podczas wielu pobytów dzieci w Klinice konieczne było także stosowanie żywienia pozajelitowego i dojelitowego.

Dostępność bogatego materiału biologicznego, pozwoliła na określenie w zwojach jelita komórek zawierających badane neurotransmitery, gęstość włókien w warstwie mięśniowej oraz liczebność włókien immunoreaktywnych w śluzówce resekowanego jelita u chorych z UC.

W usuniętym pooperacyjnie jelicie badano jaki jest procent komórek VIP, GAL i PACAP- pozytywnych w obrębie zwojów (MP; Auerbacha, OSP; Schabadascha, ISP; Meissnera) w ścianie jelita oceniając ten procent metodą immunohistochemiczną (opis metody w rozdziale „Materiał i metody”).

Do tej pory nie ukazały się prace dotyczące takiej oceny u ludzi.

Stwierdzono, że u pacjentów z UC proces chorobowy spowodował rozległe zmiany w jelitowym układzie nerwowym, które dotyczyły liczby włókien nerwowych w śluzówce, gęstości włókien w mięśniówce jelita oraz zmieniła w zwojach MP, OSP i ISP procent komórek VIP, GAL i PACAP- pozytywnych w porównaniu z dziećmi z grupy porównawczej, operowanych z nagłych przyczyn chirurgicznych, bez procesu zapalnego w jelicie.

Spadek liczebności komórek VIP-IR wynosił 11,2%, 14,5% i 17,1% w zwojach Auerbacha (MP), Schabadascha (OSP) i Meissnera (ISP), w porównaniu z pacjentami bez stanu zapalnego operowanymi z nagłych przyczyn chirurgicznych, u których procent komórek VIP-IR wynosił odpowiednio w zwojach – 33,6%, 29,6%, 32,6% (Tab. 54, ryc. 23-26).

Gęstość włókien VIP-IR w mięśniówce jelita również różniła się znacząco w obu grupach – była znacznie obniżona u dzieci chorych (29,97 włókna/pole widzenia) w porównaniu z grupą dzieci bez procesu zapalnego w jelicie (68,26 włókna/pole widzenia) (ryc. 27-28).

Różnice te dotyczyły również liczebności komórek PACAP-IR wyrażonej w procentach wszystkich komórek w zwojach ściany jelita; i tak odpowiednio w zwojach Auerbacha (MP), Schabadascha (OSP) i Meissnera (ISP) ich procent wynosił 6,4%, 9,0%, 11,1% w każdym zwoju, a w grupie porównawczej procent komórek zawierających PACAP-IR był wyższy i wynosił 14,9%, 15,2%, 17,1% w odpowiednich zwojach MP, OSP i ISP (Tab. 55, ryc. 29-32).

Gęstość włókien PACAP-IR w mięśniówce uzyskanej z preparatów resekowanego jelita również różniła się znacząco w skrawkach uzyskanych od

chorych (11,05 włókna/pole widzenia) i była znacznie mniejsza niż w grupie porównawczej (24,37 włókna/pole widzenia) (ryc. 33-34).

Podobnie miało to miejsce w przypadku GAL-IR, gdzie obserwowano znamienne spadki liczby komórek GAL-IR (9,2%, 13,0%, 15,0%) odpowiednio w zwojach Auerbacha (MP), Schabadascha (OSP) i Meissnera (ISP) u dzieci chorych w porównaniu z grupą kontrolną (30,87%, 36,11%, 28,68% w zwojach MP, OSP i ISP) (Tab. 56, ryc. 35-38).

Gęstość włókien GAL-IR w mięśniówce jelita różniła się znacząco w skrawkach uzyskanych od osób chorujących na UC (5,7 włókna/pole widzenia) i była znamienne obniżona w stosunku do grupy porównawczej (18,42 włókna/pole widzenia) (Tab. 56, ryc. 39-40).

Uzyskanie materiału pooperacyjnego pozwoliło również na porównanie u tych samych pacjentów liczby włókien GAL-IR, VIP-IR i GAL-IR w wycinku śluzówki uzyskanego w trakcie wykonanej wcześniej (średnio 12 miesięcy przed zabiegiem operacyjnym) kolonoskopii i w śluzówce resektowanego jelita. W tej grupie chorych liczba włókien zawierających wszystkie trzy badane neurotransmitery uległa dalszemu, znacznemu obniżeniu (Tab. 57-60, ryc. 41-43).

Uzyskanie możliwości zbadania komórek nerwowych zawierających neurotransmitery protekcyjne w zwojach jelita dzięki materiałowi uzyskanemu w czasie kolektomii pozwala na znaczne poszerzenie wiedzy o stanie ENS w toku procesu zapalnego jelita. Jak już wyżej wymieniono zmniejszeniu ulegają zarówno ilości komórek nerwowych zawierających GAL, VIP i PACAP, jak i liczba włókien w śluzówce i mięśniówce jelita.

Badania w niniejszej pracy wykazały, że obniżeniu liczby włókien nerwowych badanych neuroprzekaźników w śluzówce jelita pobranej w czasie kolonoskopii towarzyszy znaczne obniżenie komórek immunoreaktywnych GAL, VIP i PACAP w zwojach jelitowych.

Badanie liczby włókien nerwowych w śluzówce jelita jest tylko częścią oceny ENS, która jest jednak możliwa w wycinku jelita pobranego w trakcie kolonoskopii i prawdopodobnie może odzwierciedlać obecność i stan struktur nerwowych ENS w dalszych częściach ścian jelita grubego.

Próba oceny zmian w kodowaniu chemicznym neuronów jelitowego układu nerwowego w zwojach ścian jelita, oraz włókien nerwowych zapośredniczących warstwę błony śluzowej w wycinkach błony śluzowej jelita grubego u pacjentów z UC pozwala stwierdzić jednoznacznie, że reakcja na przewlekły proces zapalny w jelicie wyraża się znacznym, istotnie znaczącym statystycznie obniżeniem wszystkich struktur ENS w jelicie.

Sanovic i wsp. analizują w swojej pracy na modelu zwierzęcym zachowanie się neuronów w objętych zapaleniem jelicie szczura. Proces zapalny spowodował wyraźną utratę neuronów w obrębie miejsca objętego stanem zapalnym w ciągu 24h, a także zmniejszeniem liczby neuronów o około 50%. Taki stan trwał do 35 dnia trwania eksperymentu, kiedy to

proces zapalny ulegał ograniczeniu. To eksperymentalne badanie sugerować może, że wczesne zmiany w jelicie, które pojawiają się podczas procesu zapalnego są odpowiedzialne za utratę zarówno neuronów podśluzówkowych jak i włókien w splocie mięśniówkowym.

Autor stwierdził, że znaczna liczba neuronów w każdym zwoju mięśniowym zmniejszała się podczas zapalenia śluzówki jelita i pozostawała niezmienną mimo ustąpieniu stanu zapalnego. Zmniejszenie liczby neuronów podśluzówkowych było związane z wyraźnym zmniejszeniem liczby transmiterów neuroprotektoryjnych w zwojach podśluzówkowych, co może sugerować większego stopnia uszkodzenia części jelita położonego bliżej powierzchni śluzówki. Wydaje się że proces zapalny powoduje wówczas utratę proporcji neuronów w każdym zwoju [217].

To niezwykle ciekawe doniesienie, pozwala podjąć próbę interpretacji wyników uzyskanych w niniejszej pracy. Wyniki własne są zgodne z zawartymi w pracy Sanovica spostrzeżeniami. Nie potwierdzono jedynie, co zauważył autor w swoim doniesieniu, procesu regeneracji włókien nerwowych w splocie mięśniówkowym. Spowodowane to było prawdopodobnie ciężkością stanu pacjentów, który doprowadził ich do kolektomii. W toku trwania procesu chorobowego kilkanaście miesięcy w grupie lekoopornych pacjentów, stwierdzono ewidentne obniżenie liczebności włókien nerwowych w mięśniówce jelita wobec dzieci z grupy porównawczej. Prawdopodobnie mogło nie dojść u tych chorych do proliferacji włókien nerwowych, a tym samym odnowy i regeneracji w tym obszarze jelita.

Dalsze badania są niezbędne do zidentyfikowania mechanizmu śmierci neuronów enterycznych.

Niektóre doniesienia sugerują, że za stałą degradację ENS może być odpowiedzialna zwiększona produkcja tlenu azotu podczas procesu zapalnego w jelicie. Syntetaza tlenu azotu (NOS) zawarta jest w neuronach, a wydzielany z nich tlenek azotu (NO) dyfunduje do mięśni gładkich przewodu pokarmowego, hamuje motorykę i rozszerza naczynia krwionośne. Wiadomo, że produkcja NO jest zaangażowana w proces uszkodzenia neuronów po niedokrwieniu, uszkodzeniu i w kilku innych chorobowych procesach neurodegeneracyjnych. Teorię powyższą mógłby podtrzymać fakt, że doustne podanie inhibitorów NOS zapobiegać może pogłębianiu uszkodzeń neuronów enterycznych, a tym samym może potwierdzać rolę NO w śmierci komórki [50, 51, 63, 96, 107].

Dogłębne poznanie mechanizmów udziału neurotransmiterów w schorzeniach przewodu pokarmowego stwarza uzasadnione nadzieje na przyszłość, iż możliwe będzie stosowanie środków farmakologicznych w postaci m.in. leków spazmolitycznych, przeciwbiegunkowych, przeciwzapalnych i przeciwbólowych działających poprzez receptory neuropeptydowe.

Tak więc zebrane w toku niniejszych badań informacje przynoszą morfologiczne dowody ewidentnego uszkodzenia zarówno strukturalnego jak

i czynnościowego ENS w toczącym się w jelicie w przebiegu wrzodzącego zapalenia jelita grubego procesu zapalnego u dzieci i młodzieży.

W szóstej części pracy ocenie poddano stan jelitowego układu nerwowego w zależności od odpowiedzi immunologicznej osób chorych na UC w różnych stadiach zaawansowania schorzenia oraz w zależności od stosowanej terapii

Układ immunologiczny i ENS biorą czynny udział w funkcjach jelita grubego. Wzmożony transport i hipersekrekcja mogą być skutkiem ubocznym zarówno reakcji obronnej komórek immunokompetentnych jak i działań ENS.

Silne interakcje między ENS i układem immunologicznym są dowiedzione faktem istnienia receptorów dla jelitowych neurotransmiterów na kępkach Peyera i limfocytach znajdujących się w lamina propria. Synteza neuropeptydów ma miejsce w komórkach nerwowych jelita, oraz w tkance limfatycznej związanej z jelitem. Limfocyty, makrofagi, mastocyty, komórki epitelialne zdolne są do odpowiedzi na neuropeptydy. Te ostatnie stymulują lub hamują wzrost limfocytów śluzówki i nabłonka jelita, wpływają na produkcję cytokin [75].

Osiadłe w ścianie jelita leukocyty, jak mastocyty czy makrofagi, odgrywają dużą rolę w adaptacji komórki nerwowej do procesu zapalnego, do jakiego dochodzi po uszkodzeniu jelita. Badane zależności pomiędzy ekspresją cytokin w śluzówce, a ilością włókien nerwowych ENS znajdują odniesienia w literaturze światowej, są to jednak głównie dane dotyczące eksperymentów na zwierzętach [1, 21, 58].

Zapalenie jelita indukuje sekrecję między innymi takich cytokin jak IL-1, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  w zwojach mięśniówki (nie ustalono dokładnie rodzaju komórek w zwojach i neuronach). Nieprawidłowa zawartość neuropeptydów jelitowych może wynikać z ciągłej odpowiedzi immunologicznej na stan zapalny jelit u pacjentów z IBD [262]. W świetle ostatnich badań wiadomo, że następują niezbitce interakcje takich neurotransmiterów jak VIP, PACAP i GAL z układem immunologicznym w procesie zapalnym. PACAP i VIP to rodzina peptydów obecnych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Ich neuroprotekcynny potencjał poddany był wielu badaniom. Dane sugerują ważną rolę VIP jako neuropeptydu przeciwzapalnego, który może mieć duży wpływ na immunologię układu pokarmowego. VIP silnie zmniejsza odpowiedź zapalną poprzez regulację hamującą (down-regulation) produkcji różnych mediatorów, takich jak prozapalne cytokiny IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , oraz IL-12, zaangażowanych w miejscowym i uogólnionym uszkodzeniu tkanek [35, 63].

Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, jak w trakcie procesu zapalnego w jelicie grubym zachowują się dwie grupy mediatorów tego stanu, a mianowicie cytokiny i neurotransmitery protekcynne. Czy znając zakres ich fizjologicznych zadań jesteśmy w stanie określić zależności jakie między nimi zachodzą w trakcie toczącego się w jelicie procesu zapalnego.

W niniejszej pracy określano powiązania transmitterów neuroprotekcynnych i cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych i immunostymulacyj-

nych w badanych grupach, jednak nie wskazano na statystyczne między nimi zależności.

W szczegółowej analizie statystycznej wskazano jednak na pewne subtelne związki wskazujące na zależności pomiędzy transmiterami PACAP, GAL i niektórymi cytokinami.

Stwierdzono, że przy zwiększonej liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, poziom ekspresji immunostymulacyjnej IL-18 w śluzówce zmienionego zapalnie jelita jest wyższy (Tab. 61, ryc. 44). Przy obniżeniu liczebności włókien nerwowych PACAP-IR obserwujemy statystycznie istotne obniżenie poziomu IL-18 w surowicy (Tab. 64, 65).

Ta zależność każe przypuszczać, że, pierwotnemu obniżeniu IL-18 towarzyszy wtórne obniżenie włókien nerwowych PACAP-IR na skutek zmniejszonej immunostymulacji. Podobne związki zaobserwowano pomiędzy liczebnością włókien PACAP-IR i prozapalnymi cytokinami.

Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR ulega obniżeniu przy niższych wartościach w śluzówce cytokiny prozapalnej IL-1 $\beta$ , ale podwyższonej wartości prozapalnej cytokiny – IFN $\gamma$  (Tab. 62, ryc. 45).

Z kolei wzrost poziomu przeciwzapalnej IL-10 w śluzówce jelita jest związany z podwyższoną liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR (Tab. 63).

Wydaje się, że obniżenie liczebności włókien tego neurotransmitera i jednoczesny wzrost cytokin prozapalnych IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  w śluzówce jelita z niskim poziomem IL-18 w surowicy krwi może świadczyć o miejscowej reakcji immunologicznej. Prawdopodobnie można przypuszczać, że zależności te wynikają z zaburzenia równowagi cytokin pro- i przeciwzapalnych, co może być pierwotne w stosunku do spadku poziomu neurotransmiterów.

Zależności pomiędzy poziomem cytokin, a liczbą włókien nerwowych GAL-IR stwierdzono jedynie w porównaniu z ekspresją IL-1 $\beta$ , cytokiny prozapalnej, w zmienionej śluzówce jelita. Jest ona znamienne wyższa w przypadku zwiększonej ilości włókien nerwowych GAL-IR (Tab. 66, ryc. 46). W przypadku obniżonego poziomu prozapalnego IFN $\gamma$  w surowicy stwierdza się również zwiększenie liczby włókien nerwowych tego transmitera (Tab. 67, ryc. 47).

Należy zauważyć, że większość znamienych zależności w relacji neurotransmitter – cytokina dotyczy odpowiedzi miejscowej cytokin prozapalnych i transmiterów PACAP i w znacznie mniejszym zakresie GAL.

Wydaje się to korzystnym zjawiskiem świadczącym o wspólnym, miejscowym w jelicie działaniu przeciwzapalnym transmiterów i cytokin.

Kato i wsp. wykazali, że PACAP zmniejsza produkcję cytokin zapalnych, obejmujących TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i immunoglobuliny stymulującej IL-12 i może być użyteczny w przyszłości w leczeniu chorób autoimmunologicznych [122].

W zakresie liczebności włókien nerwowych VIP-IR i poziomu cytokin w surowicy i śluzówce jelita nie stwierdzono między nimi żadnych zależności.

W wielu doniesieniach w literaturze światowej podkreślany jest fakt, że VIP odgrywa istotną rolę w reakcjach przeciwzapalnych na terenie wielu tkanek objętych procesem zapalnym.

Ciekawe pytanie stawia Pozo, w swojej pracy: czy VIP to neuropeptyd czy raczej cytokina? VIP tradycyjnie był klasyfikowany jako neuropeptyd/neurotransmitter w oparciu o jego zdolność do mediowania i regulowania funkcji neuronów. Autor sugeruje, że VIP powinien być traktowany jako cytokina ze względu na rolę jaką odgrywa w procesach neuroimmunologicznych [58, 197].

Uważa się, że PACAP i VIP mogą być kluczowe dla przyszłej terapii chorób neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych. Sugestia ta opiera się na wykazanym działaniu obu neuropeptydów polegającym na hamowaniu produkcji przez mikroglej prozapalnych mediatorów [58, 63, 234].

Z przedstawionych badań wynika, że interpretacja tych zależności jest trudna, bo niespójne są wyniki. Zjawisko to wymaga jednak dalszych badań, gdyż jednoznaczna na nie odpowiedź może w przyszłości stać się kluczem do zastosowania nowych, ukierunkowanych terapii.

W siódmej części pracy ocenie poddano wpływ obecności bakterii beztlenowych (izolowanych z wycinków jelita grubego dzieci chorych na UC) na jelitowy układ nerwowy.

Wiele toksyn bakteryjnych i wirusowych może wpływać na aktywność neuronów ENS, co prowadzi do zwiększonej sekrecji śluzówki jelita stanowiącego jej mechanizm obronny.

Udowodniono, że w ostrym zapaleniu jelit wywołanym przez toksynę A *Clostridium difficile*, pobudzeniu ulegają neurony jelitowe co manifestuje się między innymi nasileniem motoryki jelit [85, 229].

Neurony podśluzówkowe regulują proliferację i przepuszczalność komórek poprzez tzw. ciasne łąca (*tigh junction*) za pośrednictwem szlaków VIP-zależnych. Należy zadać pytanie czy znaczny wzrost ekspresji VIP w toku UC oraz w niektórych chorobach infekcyjnych przewodu pokarmowego można interpretować jako mechanizm ochronny przed ingerencją patogenu, czy jest to mechanizm naprawczy?

Czynniki infekcyjne, takie jak *Clostridium difficile*, *Schigella flexneri* są zdolne do zapoczątkowania ostrych zmian w jelicie i generują odpowiedź na ten proces ekspresją VIP. Udowodniono, że w toku infekcji wymienionymi bakteriami wzrasta zdecydowanie ekspresja VIP jako odpowiedź na ostry stan zapalny w jelicie.

Utrzymujące się zmiany w ENS, w tym zmiany w zawartości neuro-mediatorów, mogą być odpowiedzialne za niektóre objawy występujące w tej chorobie, a głównie zaburzenia motoryki.

Wciąż brak jest jeszcze udowodnionych danych na temat związku ENS i IBD w zakresie reakcji zapalnej wywołanej przez patogen bakteryjny i degeneracji neuronów w toku choroby [173, 221].

Rychlik i wsp. poddali analizie zachowanie się rozkładu włókien nerwowych/neuronów u świń w biegunce bakteryjnej i wirusowej. Na podstawie badań immunofluorescencyjnych wycinków jelita tych zwierząt wykazano wzrost liczby struktur nerwowych (tak włókien jak i neuronów) GAL i SP. W mniejszym stopniu wyrażony był wzrost ilości i gęstości struktur zawierających SOM czy VIP. Podkreślono, że nie zauważono różnic w badanym materiale w jelicie świń z biegunką o etiologii wirusowej czy bakteryjnej [211].

W literaturze nie ma odniesień do badań u ludzi analizujących odpowiedź ENS na wskazany czynnik bakteryjny. Niniejsze badania mogą stanowić wstęp do dalszych obserwacji tego zagadnienia.

Analizując w niniejszej pracy zależności liczebności włókien nerwowych GAL-IR, VIP-IR, PACAP-IR od obecności w jelicie bakterii beztlenowych oparto się na wynikach przeprowadzonych badań mikrobiologicznych wycinków śluzówki jelita w grupie dzieci chorych na UC.

W większości biopłatów kątnicy wykazano dominację bakterii z rodzaju *Bacteroides* i *Clostridium*, a w tej grupie u połowy dzieci stwierdzono szczepy bakterii syntetyzujących siarkowodor. Głównie były to bakterie z rodzaju *Bacteroides* spp (Tab. 35).

Przeprowadzona analiza nie wykazała różnic w zależnościach pomiędzy liczebnością włókien nerwowych GAL-IR, VIP-IR, PACAP-IR od obecności w jelicie beztlenowych bakterii redukujących siarkę (SRB+) i bakterii nieredukujących siarki (SRB-) (Tab. 68-70, ryc. 48).

Szczegółowa ocena statystyczna wykazała, że osoby z obniżoną liczbą włókien nerwowych VIP-IR mają częściej stwierdzaną obecność bakterii redukujących siarkę (SRB+), a osoby, u których liczba włókien nerwowych jest większa, mają częściej stwierdzaną obecność bakterii nieredukujących siarkę (SRB-) (Tab. 71).

W zakresie pozostałych neurotransmiterów szczegółowym badaniem statystycznym żadnych zależności nie stwierdzono.

Podnoszona w badaniach rola VIP i jego powiązań z patogenami jelitowymi jakie stanowią bakterie, znalazła w tych wstępnych badaniach swoje potwierdzenie. Wskazano w nich na różnice w liczebności włókien nerwowych VIP-IR w zależności od wyhodowanego z wycinków śluzówki jelita u chorych z UC szczepu SRB+ i SRB- bakterii beztlenowych.

Jednak odpowiedź w jakim stopniu ENS pełni rolę naprawczą w błonie śluzowej jelita, a w jakim niewydolność ENS wiąże się z patologicznym rozrostem śluzówki pod wpływem stwierdzonego w niej patogenu – to zagadnienia do dalszych badań.

Wciąż brak jest udowodnionych danych na temat związku pomiędzy ENS a etiopatogenezą IBD. Dotyczy to zarówno stopnia zaawansowania degeneracji neuronalnych struktur tego układu w jelicie (włókna, komórki

w zwojach jelitowych wraz z neuroprzebiegami) jak i nasilenia procesu zapalnego, w którym niewątpliwą rolę odgrywa szeroki wachlarz cytokin (pro-, przeciwzapalnych i immunostymulacyjnych) oraz niektóre czynniki bakteryjne.



## 9. Wnioski

1. Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR w śluzówce jelita grubego w przebiegu UC u dzieci i młodzieży jest znacznie obniżona i świadczy o głębokich zmianach destrukcyjnych włókien nerwowych w zmienionej zapalnie tkance jelita. Wynikiem tego jest utrata zdolności neuroprotekcyjnych i adaptacyjnych (plastyczności) jelitowego układu nerwowego.
2. W biopsjach śluzówki jelita pobranych pierwotnie w czasie kolonoskopii oraz później u tych samych pacjentów w wycinkach śluzówki z resekowanych jelit, stwierdzono obniżanie się liczebności immunoreaktywnych włókien nerwowych VIP, PACAP, GAL co może świadczyć, że postęp choroby prowadzi do pogłębienia utraty włókien nerwowych i postępującego procesu degradacji jelita u chorych nie poddających się leczeniu.
3. W lekoopornych postaciach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego obserwowano w ścianie resekowanego jelita (w toku kolektomii) dodatkowo bardzo znaczne zmniejszenie liczby komórek GAL, VIP i PACAP-pozytywnych w śródściennych zwojach jelita oraz włókien nerwowych w warstwie mięśniowej.
4. Niedobór GAL-IR stwierdzany u chorych na UC może być przyczyną zaburzeń w sekrecji i wchłanianiu elektrolitów przez uszkodzoną barierę enterocytarną, co może manifestować się nasileniem częstotliwości wolnych stolców
5. Wzrost poziomu ekspresji genu IL-18, TNF $\alpha$ , a w mniejszym stopniu IL-10 i IL-12 w wycinkach błony śluzowej w grupie chorych w porównaniu z grupą porównawczą może świadczyć o miejscowej reakcji immunologicznej; podwyższone poziomy IL-8, IL-12, IL-18 w surowicy i niski poziom IL-10 wskazują na brak równowagi między aktywnością cytokin o charakterze prozapalnym i immunostymulacyjnym (IL-8, IL-12, IL-18) oraz niewystarczającej w tej grupie chorych aktywacji przeciwzapalnej cytokiny (IL-10). Może stanowić to jeden z czynników, prowadzących do rozwoju i utrzymywania się procesu zapalnego w UC.
6. W grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego u ponad 90% pacjentów, stwierdzono w hodowli wycinków śluzówki jelita współudział beztlenowej flory jelitowej, a obecność szczepów tych bakterii o zdolnościach do redukcji siarki (SRB+) wydaje się dla tego schorzenia dość specyficzna. Ocena tych bakterii powinna być zatem uwzględniona w diagnostyce bakteriologicznej u chorych na UC.
7. Badanie wycinków śluzówki jelita pobieranych w trakcie kolonoskopii powinno rutynowo uwzględniać ocenę liczby włókien transmitterów neuroprotekcyjnych.

## 10. Streszczenie

Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit pozostaje nadal nieznaną. Na świecie obserwuje się stale rosnącą liczbę nowych przypadków tych chorób. Obecnie klasyczne postaci tego schorzenia rozpoznawane są już u trzyletnich dzieci, a nawet u niemowląt i dzieci w wieku przedszkolnym. Coraz częściej, z powodu nieskuteczności leczenia, lekarz stoi wobec decyzji konieczności wykonania zabiegu operacyjnego kolektomii u pacjenta w tej grupie wiekowej. do chwili obecnej nie ustalono wszystkich możliwych czynników biorących udział w powstawaniu IBD, zaś wyniki badań dotyczących etiopatogenezy są niespójne i często rozbieżne.

Bierze się pod uwagę uczestnictwo kilku czynników sprawczych, między innymi genetycznych, środowiskowych i immunologicznych.

Rola czynników genetycznych jest ogólnie uznana i wynika z obserwacji obejmujących zwiększone występowanie, (zarówno UC jak i CD) w rodzinach pacjentów z IBD, szczególnie w pierwszym pokoleniu. Potwierdzone to jest szerokimi badaniami genetycznymi.

Powtarzające się próby dowiedzenia, że IBD wynika z infekcji bakteryjnej, (najczęściej patogenem z grupy beztlenowców), są ciągle przedmiotem wielu badań i obecny poziom wiedzy dotyczący patogenezy IBD nie do końca wyklucza tę etiologię.

Koncepcja, że zasadniczą przyczyną IBD jest nieprawidłowa reakcja immunologiczna zasadza się na obserwacji, że IBD charakteryzuje się masywnym naciekiem komórkowym w jelitach objętych procesem zapalnym. Jest to związane z nieprawidłowościami w układzie immunologicznym, polegającym na zaburzonej produkcji z towarzyszącą dysfunkcją komórek T.

Istnieją dane, że chorzy z IBD posiadają nieprawidłową odpowiedź T-komórkową przeciwko składnikom antygenowym swojej własnej mikroflory jelitowej. Komórki nabłonkowe, poprzez produkcję chemokiny, biorą udział w chemotaksji komórek ostrego stanu zapalnego w miejscach uszkodzenia w IBD i przez to inicjują głęboką destrukcję tkankową wynikającą z tego procesu.

Uszkodzenie tkanek powoduje strukturalne i funkcjonalne zmiany jelitowego układu nerwowego (ENS).

Do niedawna wiedza na temat roli ENS w kontroli funkcji przewodu pokarmowego z powodu trudności w wykonaniu takich badań u ludzi, oparta była o badania na zwierzętach.

Od wielu lat w literaturze światowej znajdują się doniesienia, w których badacze próbują odpowiedzieć na pytanie w jakim stopniu zaangażowany jest ENS w procesie zapalnym jelita. Zainteresowanie tym problemem wynika z funkcji jaką spełnia jelitowy układ nerwowy w przewodzie pokarmowym. Aktywność narządów układu pokarmowego (głównie żołądka i jelit) jest kontrolowana przede wszystkim przez neurony enteryczne i stosunkowo dużo wia-

domo o ich morfologii, neurochemizmie i funkcjach w warunkach fizjologicznych, lecz nie w trakcie procesów chorobowych.

Odpowiedź ENS na stan zapalny jest różna w zależności od miejsca i typu procesu zapalnego, z czynnościowymi i prawdopodobnie morfologicznymi konsekwencjami zależnymi od natury stymulatorów procesu zapalnego. Dane immunohistochemiczne uzyskane od chorych z IBD i Modeli zwierzęcych wskazują, że proces zapalny zmienia neurochemiczną funkcję pewnych klas neuronów jelitowych.

Plastyczność ENS, czyli adaptacja systemu nerwowego poprzez funkcjonalne dopasowania się komórki nerwowej do zmienionych warunków jest cechą towarzyszącą stanom zapalnym jelit.

W doniesieniach naukowych z ostatnich kilku lat podtrzymuje się w nich znaczenie aktywnej roli zwojów jelitowych w neuronalnej i neuroimmunologicznej komunikacji w obrębie przewodu pokarmowego z lokalnym uwalnianiem neurotransmiterów, szczególnie podczas procesu zapalnego jelit.

Ciekawe wydaje się szczególnie zagadnienie odpowiedzi na przewlekły proces zapalny jelit neurotransmiterów protekcyjnych – wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), peptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylową (PACAP), galaniny (GAL), wybranych cytokin i zaangażowania w ten proces czynnika bakteryjnego.

Dogłębne poznanie mechanizmów przewlekłego procesu zapalnego jelit, poprzez ocenę ENS w wycinkach śluzówki jelita być może przyczyni się do uzyskania odpowiedzi na pytanie czy można będzie ustalić kierunki terapii celowanej, poprzez wykorzystanie wpływu niektórych leków na receptory neuropeptydowe.

Założono następujące cele pracy:

- ocenę ilościową włókien nerwowych i neuronów jelitowego układu nerwowego zawierających neurotransmitery protekcyjne (GAL, VIP, PACAP) u pacjentów z UC zarówno w śluzówce jak i ścianie jelita grubego
- ocenę zawartości mRNA w śluzówce jelita grubego i stężenia w surowicy krwi dzieci chorych na UC wybranych cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych i immunostymulacyjnych
- ocenę florę jelitową dzieci chorych na UC, w hodowli z wycinków śluzówki jelita grubego ze szczególnym uwzględnieniem obecności szczepów beztlenowych
- ocenę zmian zachodzących w jelitowym układzie nerwowym w stosunku do miejscowej odpowiedzi immunologicznej oraz czynnika bakteryjnego w różnych stadiach zaawansowania schorzenia, czasu trwania choroby i stosowanej terapii.

Materiał i metody: Pracę wykonano w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM w Gdańsku (Pracownia Endoskopii Klinicznej), w Zakładzie Bakteriologii Klinicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku, w Katedrze Histologii

i Immunologii AM w Gdańsku, oraz w Katedrze Fizjologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olszynie, Materiał do badań immunofluorescencyjnych ściany jelita uzyskano od operowanych pacjentów w trakcie kolektomii. Ocenę histopatologiczną preparatów wykonano w Zakładzie Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku.

Badaniami objęto 45 pacjentów.

Chorych podzielono na następujące grupy:

- grupa I N=33 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego
- grupa Ia N=7 pacjentów po kolektomii (z grupy 33 chorych)
- grupa II N=9 pacjentów, u których na podstawie badania koloskopowego i histopatologicznego wykluczono IBD. Stanowią oni grupę porównawczą
- grupa III N=3 pacjentów bez zmian zapalnych jelita grubego, u których przeprowadzono resekcję jelita grubego z powodu ostrych przyczyn chirurgicznych. Stanowią oni grupę porównawczą.

W kryteriach włączenia uwzględniono pacjentów u których na podstawie wywiadu, badania fizykalnego i badań dodatkowych stwierdzano wskazania do diagnostyki endoskopowej dolnego odcinka przewodu pokarmowego celem ustalenia rozpoznania. Do badania włączono również chorych, u których kolonoskopię wykonano w trakcie leczenia UC celem oceny skuteczności lub weryfikacji stosowanej terapii. Pacjenci kierowani do diagnostyki dolnego odcinka przewodu pokarmowego, (głównie z powodu zawartości krwi w stolcach) u których badanie endoskopowe i histopatologiczne nie wykazało zmian, zakwalifikowani zostali do grupy porównawczej.

U chorych poddano analizie następujące parametry:

- dokonano oceny jelitowego układu nerwowego (ENS) w wycinkach śluzówki jelita grubego analizując liczebność immunoreaktywnych włókien nerwowych oraz zawartość neurotransmiterów protekcyjnych w zwojach ściany jelita grubego.
- oceniano florę jelita grubego w oparciu o hodowlę wycinków jelita grubego
- dokonano także oceny odpowiedzi immunologicznej ogólnej i miejscowej na przewlekły proces zapalny w jelicie grubym

Wszystkie parametry rozpatrywano w odniesieniu o szczegółową analizę stanu klinicznego i wskaźników zaawansowania choroby.

Uzyskane wyniki analizy stanu klinicznego pacjentów, wybranych badań laboratoryjnych, bakteriologicznych immunologicznych oraz ocenę jelitowego układu nerwowego (ENS) poddano analizie statystycznej

W pierwszej części rozdziału „wyniki” poddano analizie dokumentację medyczną 33 chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i 9 pacjentów zakwalifikowanych do grupy porównawczej.

Z wywiadu uzyskano dane, z których ustalono fakt nie występowania schorzeń jelit w rodzinie u większości badanych.

Czas trwania choroby przed przyjęciem do Kliniki wynosił średnio 3 miesiące. W grupie chorych na UC nie stwierdzono różnic w zakresie płci, a średnia wieku w badanych grupach wynosiła 13,7 lat. Wartości wskaźnika Cole'a świadczyły o prawidłowym odżywieniu lub umiarkowanym niedożywieniu pacjentów w badanej grupie. Głównym powodem zgłoszenia się do lekarza była biegunka i zawartość krwi w stolcach.

Badania laboratoryjne wykazały odchylenia od normy przede wszystkim w zakresie wykładników stanu zapalnego. W analizie uwzględniono stosowaną terapię, w tym preparaty zawierające kwas 5-aminosalicylowy (5-ASA), sterydoterapię, leczenie immunosupresyjne, antybiotykoterapię, metronidazol i stosowanie probiotyków. W grupie badanych chorych dominowali pacjenci z łagodną i umiarkowaną postacią choroby (93,9%).

Następnie (druga część rozdziału „wyniki”) ocenie poddano ekspresję wybranych cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych i immunomodulacyjnych: IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18 w wycinkach błony śluzowej jelita grubego (metodą PCR), stężenie tych cytokin w surowicy krwi oraz zależności tych wartości z czasem trwania choroby i aktywnością schorzenia. Wykazano, że w zasadzie IL-10 i IL-1 nie są związane z oceną ciężkości choroby. Wszystkie pozostałe są różne w obu grupach. Nie stwierdzono zależności czasu trwania choroby i średniego poziomu badanych cytokin. Szczegółowa analiza statystyczna wykazała wzrost poziomu ekspresji genu IL-18, TNF $\alpha$ , a w mniejszym stopniu IL-10 i IL-12 w wycinkach błony śluzowej w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną, oraz podwyższone poziomy IL-8, IL-12, IL-18 w surowicy i niski poziom IL-10 w surowicy krwi.

Nie stwierdzono zależności czasu trwania i stopnia aktywności choroby od średniego poziomu cytokin.

Przeprowadzono także analizę poziomu cytokin w zależności od wyników hodowli beztlenowej bioptatów. Wartości średnie wszystkich cytokin porównując z wynikami hodowli bakteriologicznej, tak w hodowlach ujemnych, dodatnich SRB- i hodowli bakterii SRB+ są porównywalne. Natomiast bardziej szczegółowa analiza pozwala na subtelny wniosek z którego wynika, że u chorych, u których stwierdzono w hodowli bioptatów bakterie redukujące siarkę mają wyższy poziom ekspresji przeciwzapalnej cytokiny IL-10.

W trzeciej części rozdziału „wyniki”, analizie poddano wyniki mikrobiologiczne z hodowli wycinków uzyskanych z kątnicy oraz badań bakteriologicznych kału chorych na UC. W posiewach kału u wszystkich badanych z obu grup nie stwierdzono obecności bakterii. W grupie porównaw-

czej u wszystkich 9 badanych wyniki hodowli były ujemne, natomiast w grupie badawczej jedynie u 2 chorych były one ujemne, a u pozostałych 31 badanych hodowano bakterie *Bacteroides* i *Clostridium* (w tym u 15 badanych bakterie te miały zdolność do redukcji siarki – SRB+). W przypadkach dodatkowej hodowli, w której stwierdzono bakterie redukujące siarkę, dominowali chorzy z umiarkowaną i ciężką postacią choroby, przy hodowli bakterii SRB –, dominowali pacjenci z postacią łagodną i umiarkowaną choroby.

Kolejnej analizie poddano wyniki liczebności włókien nerwowych zaopatrujących warstwę błony śluzowej w wycinkach śluzówki jelita grubego u pacjentów z UC oraz w grupie porównawczej w różnych stadiach i stopniu zaawansowania schorzenia z uwzględnieniem stosowanej terapii (czwarta część rozdziału „wyniki”). Wykazano, że w zakresie liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR w badanych grupach zachodzi statystycznie istotna różnica w wielkości badanych neurotransmiterów w obu grupach, u chorych poziom ich był znacznie niższy. Nie obserwowano statystycznie znaczących zmian w liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR w różnych poziomach aktywności UC. Nie stwierdzono różnic w liczebności włókien PACAP, VIP i GAL immunoreaktywnych w zależności od występowania biegunki. Dopiero szczegółowa analiza statystyczna wykazała, że biegunka jest związana z większą liczebnością włókien nerwowych VIP-IR, PACAP-IR i GAL-IR.

Ze względu na niewielkie liczebności w grupach nie można wskazać na zależności statystyczne czasu trwania choroby i wartości średnich liczebności włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR, niemniej jednak bardziej szczegółowa analiza statystyczna pozwala wysnuć słaby wniosek, że dłuższemu czasowi trwania choroby towarzyszy zauważalne obniżenie liczebności włókien nerwowych GAL-IR.

Jeśli chodzi o zależność liczebności włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL od stosowania kwasu 5-ASA, sterydów i azathiopryny, nie wykazano żadnych znaczących wyników.

U osób, które otrzymywały w toku leczenia probiotyk, stwierdza się zwiększoną ilość włókien nerwowych GAL-IR i PACAP-IR w stosunku do grupy chorych, które nie otrzymywały tego leku.

W następnej części pracy (w piątej części rozdziału „wyniki”) przeprowadzono analizę oceny zmian w kodowaniu chemicznym neuronów ENS (zwojów warstwy mięśniowej Auerbacha, podśluzówkowych zewnętrznych Schabadascha i podśluzówkowych wewnętrznych Meissnera) w ścianie resekowanego jelita, oraz liczebności włókien nerwowych w mięśniówce i śluzówce jelita grubego u opornych na leczenie farmakologiczne chorych na UC po zabiegu kolektomii.

Analizie poddano 7 chorych (grupa Ia), u których średnio po 12 miesiącach leczenia nie uzyskano remisji, zmiany w jelicie nasilały się,

a stosowana terapia nie przynosiła zadawalających rezultatów. Należy nadmienić, że jest to grupa pacjentów, u której w poprzednim badaniu, wykonanym średnio 12 miesięcy wcześniej, wykazano znaczne odchylenia od normy tak w badaniach laboratoryjnych, bakteriologicznych oraz w liczebności włókien nerwowych immunoreaktywnych VIP, GAL i PACAP. Liczebność włókien immunoreaktywnych badanych transmitterów u tych chorych była znacznie obniżona wobec grupy porównawczej. Z uzyskanego materiału operacyjnego w czasie pankolektomii lub proktokolektomii pobrano z tkanek resektowanego jelita materiał, w którym oznaczano liczbę włókien -IR w mięśniówce oraz procent komórek VIP, GAL i PACAP-pozytywnych i porównano z pacjentami z grupy porównawczej III (N=3), u których zabieg resekcji jelita wykonano z przyczyn nagłych, a w jelitach nie stwierdzono stanu zapalnego. Wykazano statystycznie znamienne niższe wartości analizowanych danych u operowanych chorych z powodu UC niż w grupie porównawczej.

Porównując wartości średnie liczebności włókien nerwowych VIP-IR, PACAP-IR, GAL-IR w śluzówce jelita pobranej z resektowanego jelita i biopsji śluzówki pobranej u tych chorych w trakcie wykonanej wcześniej kolonoskopii (średnio po 12 miesiącach leczenia) stwierdzono, że w przypadku liczebności włókien IR VIP, PACAP, GAL wszystkie oznaczone wartości są statystycznie znamienne niższe w porównaniu z grupą porównawczą II (N=9)

Następnie (w szóstej części rozdziału „wyniki”) analizie poddano stan ENS w odpowiedzi na reakcję immunologiczną w różnych stadiach zaawansowania schorzenia i stosowanej terapii. Bezpośrednie badanie związków korelacyjnych, czy globalne porównywanie oczekiwanych wartości neurotransmitterów i cytokin nie wskazało statystycznych zależności.

Przy zastosowaniu szczegółowych badań statystycznych zauważono, że w zakresie liczebności włókien nerwowych PACAP-IR stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu IL-18 przy zwiększonej liczebności włókien PACAP-IR (powyżej mediany). Przy obniżeniu liczebności włókien nerwowych PACAP-IR (PACAP10-) obserwujemy statystycznie istotne obniżenie poziomu IL-18 w surowicy (obniżenie poniżej Q25-). Obniżenie liczebności włókien nerwowych PACAP-IR widzimy również przy mniejszej w śluzówce wartości IL-1  $\beta$  i podwyższonej wartości IFN $\gamma$ ; obie te cytokiny mają działanie prozapalne.

Wzrost poziomu przeciwzapalnej IL-10 w śluzówce jelita (podwyższenie powyżej Q75+) jest związany z podwyższoną liczebnością włókien nerwowych PACAP-IR. W zakresie oceny liczebności włókien nerwowych PACAP-IR ekspresja genu IL-18 jest wyższa dla liczebności tych włókien powyżej mediany.

Przy obniżeniu liczebności włókien nerwowych PACAP-IR obserwujemy statystycznie istotnie niższą wartość IL-18 w surowicy i w zmienionej śluzówce jelita IL-1 $\beta$  oraz podwyższoną wartość IFN $\gamma$  w wycinku śluzówki

jelita. Zależności pomiędzy poziomem cytokin, a ilością włókien nerwowych GAL-IR stwierdzono w ekspresji IL-1  $\beta$  w zmienionej śluzowce u chorych; jest ona znamienne wyższa w przypadku zwiększonej ilości włókien nerwowych GAL-IR. W przypadku obniżonego poziomu IFN $\gamma$  w surowicy stwierdza się również zwiększenie liczby włókien nerwowych tego transmittera. Należy zauważyć, że większość znamienych zależności w relacji neuron-cytokina dotyczy odpowiedzi miejscowej cytokin prozapalnych i transmittarów PACAP, a w znacznie mniejszym zakresie GAL.

W zakresie liczebności włókien nerwowych VIP-IR i poziomu cytokin w surowicy i śluzowce jelita nie stwierdzono żadnych zależności

Analizując w siódmej części rozdziału „wyniki” wpływ bakterii bez-tlenowych izolowanych z wycinków jelita grubego na ENS u dzieci chorych na UC poddano ocenie liczebność włókien nerwowych immunoreaktywnych PACAP, VIP i GAL w zależności od badań bakteriologicznych wycinków śluzówki jelita u chorych. W zakresie liczebności włókien nerwowych VIP-IR, PACAP-IR i GAL-IR nie stwierdzono różnic znamienych statystycznie. W szczegółowej analizie statystycznej opartej na częstości przekroczenia wartości mediany stwierdzono, że osoby z obniżoną liczebnością włókien nerwowych VIP-IR mają częściej w hodowli wycinków śluzówki jelita bakterie SRB+, a osoby z podwyższoną liczebnością włókien nerwowych VIP-IR mają wprawdzie również często dodatnie hodowle bakterii bez-tlenowych z wycinków, ale bez obecności bakterii SRB.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Liczebność włókien nerwowych PACAP-IR, VIP-IR i GAL-IR w śluzowce jelita grubego w przebiegu UC u dzieci i młodzieży jest znacznie obniżona i świadczy o głębokich zmianach destrukcyjnych włókien nerwowych w zmienionej zapalnie tkance jelita. Wynikiem tego jest utrata zdolności neuroprotekcyjnych i adaptacyjnych (plastyczności) jelitowego układu nerwowego.
2. W biopatach śluzówki jelita pobranych pierwotnie w czasie kolonoskopii oraz później u tych samych pacjentów w wycinkach śluzówki z resekowanych jelit, stwierdzono obniżanie się liczebności immunoreaktywnych włókien nerwowych VIP, PACAP, GAL co może świadczyć, że postęp choroby prowadzi do pogłębienia utraty włókien nerwowych i postępującego procesu degradacji jelita u chorych nie podających się leczeniu.
3. W lekoopornych postaciach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego obserwowano w ścianie resekowanego jelita (w toku kolektomii) dodatkowo bardzo znaczne zmniejszenie liczby komórek GAL, VIP i PACAP-pozytywnych w śródściennych zwojach jelita oraz włókien nerwowych w warstwie mięśniowej.
4. Niedobór GAL-IR stwierdzany u chorych na UC może być przyczyną zaburzeń w sekrecji i wchłanianiu elektrolitów przez uszkodzona ba-



rierę enterocytarną, co może manifestować się nasileniem częstotliwości wolnych stolców.

5. Wzrost poziomu ekspresji genu IL-18, TNF $\alpha$ , a w mniejszym stopniu IL-10 i IL-12 w wycinkach błony śluzowej w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną może świadczyć o miejscowej reakcji immunologicznej; podwyższone poziomy IL-8, IL-12, IL-18 w surowicy i niski poziom IL-10 wskazują na brak równowagi między aktywnością cytokin o charakterze prozapalnym i immunostymulacyjnym (IL-8, IL-12, IL-18) oraz niewystarczającej w tej grupie chorych aktywacji przeciwzapalnej cytokiny (IL-10). Może stanowić to jeden z czynników, prowadzących do rozwoju i utrzymywania się procesu zapalnego w UC.
6. W grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego u ponad 90% pacjentów, stwierdzono w hodowli wycinków śluzówki jelita współdziałanie beztlenowej flory jelitowej, a obecność szczepów tych bakterii o zdolnościach do redukcji siarki (SRB+) wydaje się dla tego schorzenia dość specyficzna. Ocena tych bakterii powinna być zatem uwzględniona w diagnostyce bakteriologicznej u chorych na UC.
7. Badanie wycinków śluzówki jelita pobieranych w trakcie kolonoskopii powinno rutynowo uwzględniać ocenę liczby włókien transmiterów neuroprotekcyjnych.

## 11. Summary

*Pathogenesis of idiopathic bowel disease (IBD) remains unknown. The incidence of the disease is growing. Classical types of idiopathic bowel disease (IBD) are diagnosed even in small children and newborns. Very often due to untreatable character of the disease physician is faced with the decision to operate the patient in this age group. Until now not all potential factors contributing to the pathogenesis of IBD are known and results of the studies looking at etiopathogenesis are inconsistent. The role of genetic, immunological and environmental factors is being considered.*

*Contribution of genetic factors is generally accepted and results from observations of increased incidence (of both UC and CD) in families of patients with IBD especially in the first generation. Those observations have been confirmed in genetic studies.*

*The hypothesis that IBD results from bacterial infection (most often caused by anaerobes) remains subject of numerous studies and this etiology at present cannot be excluded.*

*The hypothesis of impaired immunological reaction results from observations of massive cellular infiltration found in bowels and is associated with disturbances of immunological system, abnormal production of antibodies and T-cells dysfunction.*

*According to some data patients with IBD are characterized by T-cell response to antigens of their own bowel microflora. Epithelial cells via chemokines production are involved in chemotaxis of acute inflammation cells at the sites of injury in IBD and in this way initiate profound tissue destruction resulting from the process of inflammation. Tissue injury causes structural and functional changes of enteric nervous system (ENS).*

*Until recently knowledge about the role of ENS in the control of gastrointestinal tract function originates from experimental studies due to the difficulties in performing such studies in humans. For many years authors have been trying to determine the role of ENS in bowel inflammation. Activity of organs of gastrointestinal tract is controlled by enteric neurons. Relatively much is known about their morphology and function in physiology but not in disease such as IBD.*

*ENS reaction to the inflammation differs depending on the site and type of inflammation with functional and structural consequences which depend on type of inflammation stimulators. Immunohistochemical data from patients with IBD and animal models show that inflammatory process changes function of some enteric neuron classes.*

*Plasticity of ENS that is adaptation of nervous system through functional adjustment of neurons to changeable conditions are the features of bowel inflammation.*

*Recent study results confirm active role of enteric ganglions in neurological and neuroimmunological communication within gastrointestinal tract with local release of neurotransmitters especially during the process of inflammation.*

*Of special interest seems the issue of neuroprotective transmitters response to chronic inflammation-vasoactive intestinal peptide (VIP-IR), pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-IR), galanine (GAL-IR), some cytokines and involvement of bacteriae.*

*Explanation of chronic inflammation mechanisms in the intestine through examination of ENS in specimens of intestine mucous membrane may contribute to finding of guided therapy through usage of some drugs with influence on neuropeptide receptors.*

*The aims of the study were as follows:*

- 1. to assess the number of nerve fibers and neurons of enteric nervous system in patients with UC in mucous membrane and colonic wall*
- 2. to assess the presence of selected proinflammatory, anty inflammatory and immunostimulating cytokines in colonic mucosa and serum of children with UC*
- 3. to assess microbiological composition of intestinal flora in children with UC with special attention to the presence of anaerobes in the culture of colonic mucosa specimens*

4. to assess the condition of enteric nervous system to local immunological reaction and bacteriological factor in various stages of the disease and therapy used

*Material and methods:*The study was done in the Clinic of Pediatrics, Gastroenterology and Oncology, Medical Academy, Gdańsk, The Bacteriology Department of Specialistic Provincial Hospital in Gdansk, Department of Functional Morphology University of Olsztyn (immunoflorescent studies).The Pathomorphology Departament of Specialistic Provincial Hospital in Gdansk (histopathological assessment).

45 children were included in the study

Patients were divided into four groups:

- Group I n=33 – children with colitis ulcerosa
- Group Ia n=7 patients who have undergone colectomy (out of 33 patients)
- Group II n=9 patients – the control group – children in whom IBD was excluded on the basis of colonoscopy and histopathological results
- Group III n=3 – control group, patients without bowel inflammatory disease who have undergone colectomy due to acute ileus

Inclusion criteria comprised patients in whom on the basis of history, clinical examination and laboratory results indications for endoscopic evaluation of lower gastrointestinal tract were found. Also patients with IBD who have undergone colonoscopy in order to confirm efficacy or verify treatment were included in the study. Patients who were referred for lower intestinal tract diagnostic procedures (due to the presence of occult blood in stool) and in whom endoscopic and histopathological studies were negative formed the control group.

Following parameters were analysed in studied patients:

1. condition of enteric nervous system (ENS) in colonic mucosa specimens in which number of immunoreactive nerve fibers and presence of neuroprotective transmitters in enteric wall ganglions
2. colonic flora composition on the basis of colonic specimen cultures
3. general and local immunological reaction

All parameters were evaluated with reference to detailed analysis of clinical state of the patients and indexes of disease progression..

Results of patients clinical condition analysis, selected laboratory, bacteriological and immunological results as well as assessment of ENS were analysed statistically.

In the first part of the chapter “Results” medical documentation of 33 patients with ulcerative colitis and of 9 children from the control group was analysed. On the basis of history in majority of patients family history disease of the colon was excluded. Mean disease duration before admission was 3 months. In the group of children with UC no difference in sex

was observed and mean age in the studied groups was 13.7 years. Cole index values confirmed good nutrition status or mild undernutrition of patients in studied groups. The main reason for seeing the doctor was diarrhoea and presence of blood in stool.

Laboratory studies showed abnormal results mainly in the indexes of inflammation. Analysis was performed according to therapy used including 5 aminosalicylic acid (5-ASA) preparations, steroids, immunosuppression, antibiotics and probiotics.

Subsequently (second part of the chapter "Results") expression of genes of selected proinflammatory, anti-inflammatory and immunomodulating cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18 in colonic mucosa segments, serum concentration of the cytokines and correlation of the values with disease duration and activity. No correlation of mean cytokines concentration and disease duration was observed. Detailed statistical analysis revealed increased expression of IL-18 and TNF  $\alpha$  and to lesser degree of IL-10 and IL-12 in mucosa specimens as well as increased levels of IL-8, IL-12 and IL-18 and low serum concentrations of IL-10 in the group of patients vs control group. No correlation between duration and activity of the disease was found.

Analysis of cytokine concentrations according to anaerobic culture of biopsy specimens was also performed. Mean levels of all cytokines as compared with the results of bacteriological culture in negative cultures, SRB (-) and cultures of bacteria SRB (+) are similar. More detailed analysis revealed that patients in whom cultures of biopsy specimens show presence of sulphate reducing bacteria have higher levels of anti-inflammatory cytokine IL-10.

In the third part of the chapter "Results" cultures results of caecal biopsy specimens and results of microbiological examination of stools from patients with UC were analysed. Stool cultures in all studied patients from both groups were negative. In the control group in all 9 patients stool cultures were negative and in the studied group cultures were negative in only 2 cases in the remaining 31 cases *Bacteroides* sp and *Clostridium* were observed (in 15 patients the bacteria were sulphate-reducing bacteria – SRB+). In cases of positive cultures in which sulphate-reducing bacteria were found most specimens were from the patients with moderate and severe disease.

In the fourth part of the chapter "Results" number of nerve fibers in colonic mucous membrane biopsy specimens in patients with UC and in the control group in various stages and progression of the disease according to therapy used. No statistically significant change in the number of PACAP-IR, VIP-IR, and GAL-IR nerve fibers in patients with different stages of UC activity. Only additional statistical analysis revealed that di-

*arrhoea is associated with the increased number of VIP, PCAP and GAL-IR nerve fibers.*

*Due to the small number of patients in the studied groups we were unable to find correlation between disease duration and mean number of PACAP-IR, VIP-IR and GAL-IR nerve fibers but more detailed statistical analysis allows us to conclude that longer disease duration is accompanied by decrease in the number of GAL nerve fibers.*

*No significant correlation between number of PACAP, VIP and GAL nerve fibers and treatment with 5-ASA, steroids or azathioprin was found.*

*In patients receiving probiotics increased number of GAL and PACAP nerve fibers was observed.*

*In the next part of the dissertation (fifth part of the chapter "Results") analysis of changes in chemical coding of ENS neurons (Auerbach ganglions of muscular layer, Schabadasch submucosal external ganglions and Meissner submucosal internal ganglions) in the wall of resected intestine and number of nerve fibers in muscular layer and mucous membrane of the intestine in patient with resistant to pharmacological treatment UC who have undergone colectomy was performed.*

*Data from 7 patients (group Ia n=7) were analysed in whom no remission was achieved after 12 months of treatment (mean), changes in the intestine were progressing and the therapy used was not effective. It is worth noting that in this group of patients in the previous examinations performed about 12 months earlier significant abnormalities were observed in the laboratory and bacteriological results and in the number of VIP, GAL and PACAP nerve fibers. From the resected intestine fragments obtained during pancolectomy or proctocolectomy specimens were taken in which number of fibers in muscular layer and percentage of VIP, GAL and PACAP-IR cells were determined. The obtained results were compared with data from 3 patients from control group III who have undergone intestine resection for ileus. Statistically significant lower values of analysed data were found in patients who were operated due to UC as compared to the control group (n=9).*

*Next (in the sixth part of the chapter "Results") status of ENS in response to immunological reaction in various stages of the disease progression and according to therapy used. Direct analysis of correlations or global comparison of expected values of neurotransmitters and cytokines did not show statistical significance.*

*When more detailed statistical analysis was performed we were able to observe that higher level of IL-18 gene expression for increased number of PACAP fibers (above median) was present. With decreased number of PCAP nerve fibers (PCAP10-) statistically significant decrease of serum IL-18 level (below Q25). Decrease in the number of PACAP fibers*

can be also observed with the lower  $IL-1\beta$  and increased level of  $IFN\gamma$  in the mucous membrane. Both cytokines have proinflammatory action.

Increase in the level of anti-inflammatory  $IL-10$  in mucous membrane of the intestine (above  $Q75+$ ) is associated with increased number of PACAP nerve fibers.  $IL-18$  gene expression is higher for the number of PACAP nerve fibers above the median. With lowering of the PACAP nerve fibers number statistically significant lower serum level of  $IL-18$  and expression of  $IL-1\beta$  in mucous membrane and increased expression of  $IFN\gamma$  in mucous membrane. Associations between cytokines levels and number of GAL nerve fibers were observed in  $IL-1\beta$  expression in intestine mucous membrane. The  $IL-1\beta$  is significantly higher in cases with increased GAL nerve fibers. In cases with decreased levels of serum  $IFN\gamma$  increased number of nerve fibers of this neurotransmitter are observed. It has to be noted that most of the significant correlations between the neuron and cytokine applies to local reaction of proinflammatory cytokines and PACAP transmitters and to lesser degree GAL. No correlations between VIP nerve fibers number and cytokine levels in serum and mucous membrane of the intestine were found.

In order to analyse in the seventh part of the chapter "Results" the influence of anaerobic bacteria isolated from specimens of the colon from children with UC on ENS number of PACAP, VIP and GAL according to microbiological results was examined. No statistically significant difference in the number of VIP, PACAP and GAL nerve fibers was found. In the detailed statistical analysis based on the frequency of exceeding median it was observed that in patients with decreased number of VIP fibers more often microbiological studies of their intestine specimens show presence of SRB+ bacteria and patients with increased number of VIP fibers also have positive cultures of intestine specimens but no SRB bacteria are found.

On the basis of the results it is possible to conclude:

1. The number of PACAP-IR, VIP-IR and GAL-IR nerve fibers in the mucosa of the colon of the children and adolescents with UC is significantly decreased and reflects profound destructive changes in nerve fibers which results in the loss of neuroprotective and adaptive capacity of ENS (plasticity loss)
2. Decreased number of VIP, PACAP, GAL nerve fibres was observed in the specimens obtained during colonoscopy and from intestine mucous membrane taken from resected intestines of the same patients. This may reflect progression of the intestine degradation in patients who are resistant to treatment.
3. In resistant to treatment types of ulcerative colitis significant decrease of GAL-IR, VIP-IR and PACAP-IR cells in the intramural

*ganglia and of fibers in the muscular layer of the wall of resected intestine were observed.*

- 4. Deficiency of GAL-IR nerve fibers observed in patients with UC can cause disturbances in electrolyte secretion and absorption through damaged intestinal wall which may manifest as diarrhea*
- 5. The increased expression of IL-18, TNF and, to the lesser degree, of IL-10 and IL-12 genes in the specimens from intestine comparing to the control group may reflect local immunological reaction; increased serum levels of IL-8, IL-12, IL-18 and low serum level of IL-10 suggest imbalance between activity of proinflammatory and immunostimulating cytokines (IL-8, IL-12, IL-18) and insufficient activation of proinflammatory cytokine (IL-10) in this group of patients. This may be one of the factors responsible for development and persistency of inflammation in UC.*
- 6. Results of microbiological studies suggest that intestinal anaerobic flora may contribute to the intestine inflammation (in over 90% patients) and the presence of anaerobic SRB (+) strains seems to be rather specific for the disease. Evaluation of these bacteria should therefore be included in the bacteriological diagnostic procedures in patients with UC.*
- 7. Examination of intestine mucous membrane specimens should routinely include assessment of the number of neuroprotective transmitters fibers.*

## 12. Piśmiennictwo

1. Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 961-971
2. Abera FN, Brensinger CM, Bilker WB, Lichtenstein GR, Lewis JD. Antibiotic use and the risk of flare of inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 459-465
3. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004; 126: 1533-1549
4. Alcalá MJ, Casellas F, Fontanet G, Prieto L, Malagelada JR. Shortened questionnaire on quality of life for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 383-91
5. Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 25: 255-281
6. Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease – environmental factors. *Hepatogastroenterol* 2000; 47: 29-43
7. Appleyard CB, Hernandez G, Rios-Bedoya CF. Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 106-111
8. Arciszewski MB, Ekblad E. Effects of vasoactive intestinal peptide and galanin on survival of cultured porcine myenteric neurons. *Regul Pept* 2005; 125: 185-92
9. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, Geboes K, Rutgeerts PJ. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down – regulates inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 22
10. Balemba OB, Hay-Schmidt A, Assey RJ, Kahwa CK, Semuguruka WD, Dantzer V. An immunohistochemical study of the organization of ganglia and nerve fibres in the mucosa of the porcine intestine. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 237-46
11. Balish E, Warner T. Enterococcus faecalis Induces Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Knockout Mice. *Am J Pathol* 2002; 160: 2253-2257
12. Bangale Y, Cavill D, Gordon T, Planque S, Taguchi H, Bhatia G, Nishiyama Y, Arnett F, Sudhir P. Vasoactive intestinal peptide binding autoantibodies in autoimmune humans and mice. *Peptides* 2002; 23: 2251-2257
13. Bartnik W. Jelito grube. In: *Gastroenterologia i hepatologia kliniczna*. Konturek S (red) PZWL, Warszawa 2001: 385-407
14. Bartnik W. Postępy w etiopatogenezy i leczeniu nieswoistych zapaleń jelit. *Med Science Rev* 2002; 1: 72-77
15. Bartnik W. Inflammatory bowel disease. *Journal Physiol Pharmacol* 2003; 54: S3: 205-210
16. Bauer FE. Galanin: a new biologically active gastrointestinal neuropeptides. *Gastroenterol* 1990; 28: 160-69
17. Benya RV, Matkowskyj KA, Danilkovich A, Hecht G. Galanin causes Cl<sup>-</sup> secretion in the human colon. Potential significance of inflammation-associated NF-kappa B activation on galanin-1 receptor expression and function. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 863: 64-77
18. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
19. Berrebi D, Languetin J, Ferkdadjji L, Foussat A, De Lagausie P, Paris R, Emilie D, Mougnot JF, Cezard JP, Navarro J, Peuchmaur MJ. Cytokines,



- chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 228-229
20. Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 332-339
  21. Bik W, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Baranowska-Bik A, Rusiecka-Kuczalek E. Vasoactive intestinal peptide can modulate immune and endocrine responses during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11: 358-364
  22. Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998; 16: 351-355
  23. Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 463-79
  24. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 848-859
  25. Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 31-8
  26. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001; 285: 643-647
  27. Bossowska A, Józefowicz A, Gonkowski S, Wojtkiewicz J, Kaleczyc J, Pidsudko Z, Majewski M. Influence of proliferative enteropathy on expression pattern of somatostatin (SOM) and galanin (GAL) in extrinsic primary afferent neurons supplying the porcine descending colon. *Polish J Vet Sci* 2004; 7: 21-23
  28. Brancheck T, Smith KE, Walker MW. Molecular Biology and Pharmacology of Galanin Receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 863: 94-107
  29. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106: 1455-1466
  30. Bretherton-Watt D, Kenny MJ, Ghatei MA, Bloom SR. The distribution of galanin message-associated peptide-like immunoreactivity in the pig. *Regul Pept* 1990; 27: 307-315
  31. Brown DR, Timmermans JP. Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 50-54
  32. Bruzzese E, Canani RB, De Marco G., Guarino A. Microflora in inflammatory bowel diseases: a pediatric perspective. *Am J Clin Gastroenterol* 2004; 38 (Suppl.): 91-93
  33. Buchner A, Iwańczak F. Etiopatogeneza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. In: *Gastroenterologia dziecięca*. Iwańczak F (red) wyd. Borgis, 2003, 166-173
  34. Bueno L, Fioramonti J. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 (Suppl.): 42-46
  35. Bueno L. Neuroimmune alterations of ENS functioning. *Gut* 2000; 47: 63-65
  36. Bullock NR, Booth JC, Gibson GR. Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2004; 5: 59-64
  37. Busto R, Prieto JC, Bodega G, Zapatero J, Fogué L, Carrero I. VIP and PACAP receptors coupled to adenylyl cyclase in human lung cancer: A study in biopsy specimens. *Peptides* 2003; 24: 429-436
  38. Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of Enteric Glial Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Glia* 2003; 41: 81-93

39. Cao SG, Wu WC, Han Z, Wang MY. Effects of psychological stress on small intestinal motility and expression of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide in plasma and small intestine in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 737-740
40. Carty E, Rampton DS. Evaluation of new therapies for inflammatory bowel disease. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 351-361
41. Chen YD, Zhou ZG, Wang Z, Gao HK, Yan WW, Wang C, Zhao GP, Peng XH. Pituitary adenylate cyclase activating-peptide and its receptor antagonists in development of acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 538-544
42. Cho JH. Significant Role of Genetics in IBD: The NOD2 Gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 (Suppl. 1): 18-22
43. Christl SU, Eisner HD, Dusel G. Antagonists effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role of these agents in the pathogenesis and treatment ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2477-2481
44. Cichy W, Kobelska-Dubiel N. Immunologiczne aspekty żywienia. *Ped Pol*; 2003; 6, 453-463
45. Ciok J, Dzieniszewski J. Palenie tytoniu a choroby układu trawienia. *Gastroenterol Pol* 1998; 5: 255-261
46. Clerc N, Furness JB. Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterol Motil*-2004; 6 (Suppl. 1): 24-27
47. Cohen SL, Moore AM, Ward WE. Interleukin-10 Knockout Mouse: A Model for Studying Bone Metabolism During Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 557-563
48. Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, Hoiby N, Harms BA, Thomsen OO, Skibsted U, Binder V. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4373-4381
49. Cooke HJ. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 77-80
50. Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000; 47 (Suppl 4): 15-19
51. Costagliola A, De Man JG, Majewski M, Lakomy M, Cecio A, Robberecht P, Pelckmans PA, Adriaensen D, Timmermans JP. Coexistence of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory and excitatory neurotransmitters in a large neuronal subpopulation in the vaginal segment of the chicken oviduct. *Auton Neurosci* 2004; 31 (112): 37-48
52. Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, De Lacalle S, Mufson EJ. Galanin in Alzheimer disease. *Mol Interv*. 2003; 3: 137-56
53. Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S. Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2003; 4: 9-20
54. Das KM, Farag SA. Current medical therapy of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 483-489
55. De Giorgio R, Stanghellini V, Barbara G, Corinaldesi R, De Ponti F, Tonini M, Bassotti G, Sternini C. Primary enteric neuropathies underlying gastrointestinal motor dysfunction. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 114-22
56. De Ponti F. Physiopathology of the enteric nervous system: recent advances and clinical implications. *Recenti Prog Med* 2002; 93: 40-44
57. Dejaco C, Reinisch W, Lichtenberger C, Waldhoer T, Kuhn I, Tilg H, Gasche C. In vivo effects of recombinant human interleukin-10 on lymphocyte phenotypes and leukocyte activation markers in inflammatory bowel disease. *J Investig Med* 2000; 48: 449-456

58. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, Leceta J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med* 2002; 1: 16-24
59. Deplancke B, Finster K, Graham WV, Collier VT, Thurmond JE, Gaskins HE. Gastrointestinal and Microbial Responses to Sulfate-Supplemented Drinking Water in Mice. *Exp Biol Med* 2003; 228: 424-433
60. Dogrukol-Ak D, Tore F, Tuncel N. Passage of VIP /PACAP/ Secretin Family Across the Blood-Brain Barrier: Therapeutic Effects. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1325-1340
61. Dionne S, Laberge S, Deslandres C, Seidman EG. Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 108-114
62. Duffy M, O'Mahony L, Coffey JC, Collins JK, Shanahan F, Redmond HP, Kirwan WO. Sulfate-reducing bacteria colonize pouches formed for ulcerative colitis but not for familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 384-388
63. Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 (Suppl. 1): 123-128
64. Ekblom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1997; 13: 289-299
65. El-Salhy M. Effects of triple therapy with octreotide, galanin and serotonin on a human colon cancer cell line. *Oncol Rep* 2005; 13: 45-49
66. Entschladen F, Lang K, Drell TL, Joseph J, Zaenker KS. Neurotransmitters are regulators for the migration of tumor cells and leukocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 467-82
67. Ermilov LG, Schmalz PF, Miller SM, Szurszewski JH. PACAP modulation of the colon inferior mesenteric ganglion reflex in the guinea pig. *J Physiol* 2004; 560: 231
68. Farthing MJ. Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004; 18: 233-239
69. Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 286-299
70. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 87-96
71. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004; 72: 143-164
72. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-249
73. Furuya D, Yagihashi A, Komatsu M, Masashi N, Tsuji N, Kobayashi D, Watanabe N. Serum interleukin-18 concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *J Immunother* 2002; 25 (Suppl. 1): 65-67
74. García-Fernández MO, Solano RM, Carmena MJ, Busto R, Bodega G, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC, Sánchez-Chapado M. Expression of functional PACAP/VIP receptors in human prostate cancer and healthy tissue. *Peptides* 2003; 24: 893-902
75. Genton L, Kudsk KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 2003; 186: 253-258

76. Gershon MD. The Enteric Nervous System: A Second Brain. Opioid receptor subtype control of galanin-induced feeding. *Peptides* 1996; 17: 237-240
77. Ghosh S, van Heel D, Playford RJ. Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? *Gut* 2004; 53: 620
78. Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 1999; 117: 1438-1458
79. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon R, Obłąkowski P. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek w (red.). PWN, Warszawa 2004, 204-244
80. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon R, Obłąkowski P. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek w (red.). PWN, Warszawa 2004, 235-236
81. Gonkowski S, Kamińska B, Bossowska A, Korzon M, Landowski P, Majewski M. The influence of experimental *Bacteroides fragilis* infection on substance P and somatostatin-immunoreactive neural elements in the porcine ascending colon – a preliminary report. *Folia Morphol* 2003; 62: 455-457
82. Gonkowski S, Kamińska B, Bossowska A, Landowski P, Korzon M, Majewski M. Distribution of galanin-immunoreactive neurons and nerve terminals in the colonic wall in patient suffering from drug resistant ulcerative colitis: a case report. *J. Physiol Pharmacol* 2003; 54 (Suppl. 2): 61
83. Gonkowski S, Kamińska B, Landowski P, Majewski M. Colitis-induced changes in the chemical phenotypes of mucosa-projecting nerve terminals in the human descending colon. XXI Congress of Polish Anatomical Society, Kielce 2005, 41
84. Gonkowski S, Wojtkiewicz J, Bossowska A, Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Majewski M. Proliferative enteropathy (PE)-induced changes in the number of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive (VIP-IR) neural elements in the porcine descending colon. *Polish J Vet Sci* 2004; 7: 53-55
85. Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 72-76
86. Griffiths AM. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 509-523
87. Grzybowska K. Nieswoiste zapalenie jelit u dzieci. *Postępy w leczeniu. Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2002; 4: 427-430
88. Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 793-804
89. Guerrini S, Raybould HE, Anselmi L, Agazzi A, Cervio E, Reeve JR Jr, Tonini M, Sternini C. Role of galanin receptor 1 in gastric motility in rat. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 429-438
90. Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, Quartier G, Vidon N, Giroud JP, Couturier D, Chaussade S. Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2397-2404
91. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002; 359: 1661-1665
92. Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* 2004; 126: 1582-1592
93. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: S3-9
94. Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003; 52: 1-30
95. Hansen MB. The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92: 105-113

96. Hansen MB. The Enteric Nervous System II: Gastrointestinal Functions. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92: 249-257
97. Hansen MB. The Enteric Nervous System III: A Target for Pharmacological Treatment. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 1-13
98. Hansen MB, Dresner LS, Wait RB. Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res* 1998; 47: 307-327
99. Hart AL, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Prospective Evaluation of Intestinal Homing Memory T Cells in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 496-503
100. Heczko PB, Strus M. Rola mikroflory w przebiegu przewlekłych zapaleń jelita i możliwości ich modyfikacji przez pro-i prebiotyki. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2002; 4: 105
101. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 79-94
102. Hens J, Schrödl F, Brehmer A, Adriaensen D, Neuhuber W, Scheuermann D W, Schemann M, Timmermans JP. Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *J Comp Neurol* 2000; 421: 429-436
103. Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, Lindholm J, Ekbom A, Askling J. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut* 2003; 52: 1432-1434.
104. Hollander D. Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 (Suppl. 4): 183-190
105. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 219-263
106. Imada A, Ina K, Shimada M, Yokoyama T, Yokoyama Y, Nishio Y, Yamaguchi T, Ando T, Kusugami K. Coordinate upregulation of interleukin-8 and growth-related gene product-alpha is present in the colonic mucosa of inflammatory bowel. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 854-864
107. Iwańczak F, Borowska D, Iwańczak B. Rola tlenu azotu w chorobach przewodu pokarmowego. W: *Gastroenterologia dziecięca*. Iwańczak F (red.), wyd. Borgis, 2003, 315-320
108. Jacobowitz DM, Kresse A, Skofitsch G. Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography — a historical review. *Peptides* 2004; 25: 433-464
109. Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology* 2004; 43: 416-422
110. Jump RL, Levine AD. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 462-478
111. Kamińska B. Nieswoiste zapalenia jelit u dzieci: etiologia i patogeneza. W: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A (red.). *Choroby jelita grubego u dzieci*. Wydawnictwo Adam Marszałek, Toruń 2004, 39-47
112. Kamińska B. Objawy i przebieg kliniczny najczęstszych postaci nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. W: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A (red.). *Choroby jelita grubego u dzieci*. Wydawnictwo Adam Marszałek, Toruń 2004, 48-54
113. Kamińska B, Gonkowski S, Korzon M, Bossowska A, Landowski P, Majewski M. Relations between Leu5-enkephalin — (LENK) and VIP-immunoreactive nerve fibres during human drug-resistant colitis. A case study. *Folia Morphol* 2003; 62: 509-511
114. Kamińska B, Kmiec Z, Korzon M, Landowski P, Kartanowicz D, Stasiłojć G. Ocena miejscowej aktywności cytokin oraz ich stężeń w surowicy krwi

- w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2003; 5: 107-113
115. Kamińska B, Landowski P, Korzon M, Gonkowski S, Majewski M. Zmiany w obecności galanino-immunoreaktywnych (GAL-IR) neuronów śródściennych zwojów jelitowych u pacjentów z lekoopornym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 (Suppl. 2): 61
  116. Kamińska B, Landowski P, Korzon M. Udział czynników środowiskowych w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit. *Med Wieku Rozwoj* 2003; 3: 66-71
  117. Kamińska B, Landowski P, Korzon M, Kurlenda J, Aleksandrowicz I. Skład flory bakteryjnej izolowanej z jelita grubego dzieci w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit. *Ped Współcz* 2005; 7: 167-170
  118. Kamińska B, Landowski P, Korzon M, Kurlenda J, Aleksandrowicz I, Bogucka K. Zależność pomiędzy składem beztlenowej flory bakteryjnej jelita grubego a stopniem aktywności nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2003; 5: 113-116
  119. Kamińska B, Landowski P, Korzon M, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Kmieć Z, Kartanowicz D, Kurlenda J, Aleksandrowicz I. Potential role of sulphate-reducing bacteria in etiopathogenesis of inflammatory bowel disease in children: preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39 (Suppl. 1): S319
  120. Kamm K, Hoppe S, Breves G, Schröder B, Schemann M. Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 53-60
  121. Kartanowicz D. Ekspresja cytokin prozapalnych i immunomodulacyjnych w przebiegu nieswoistych zapaleń jelita grubego u dzieci i dorosłych. Rozprawa doktorska. Gdańsk 2005; 67-79
  122. Kato H, Ito A, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Ojika K, Ueda R, Suzumura A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult Scler* 2004; 10: 651-659
  123. Keates AC, Castagliuolo I, Qiu B, Nikulasson S, Sengupta A, Pothoulakis C. CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Am J Physiol* 1998; 274: G196-202
  124. Kim SC, Ferry GD. Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology* 2004; 126: 1550-1560
  125. King TS, Woolner T, Hunter JO. Review article: the dietary management of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 17-31
  126. Kinhult J, Uddman R, Laan M, Lindén A, Cardell L-O. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide inhibits neutrophil chemotaxis. *Peptides* 2001; 22: 2151-2154
  127. Kirkup AJ, Brunnsden AM, Grundy D. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. I. Receptors on visceral afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 787-794
  128. Kirsner JB, Shorter RG. Inflammatory Bowel Disease. *Williams-Wilkins*, Baltimore 1995, issue 4, 355-379
  129. Kmieć Z. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp* 1998; 46: 143-55
  130. Kmieć Z, Kartanowicz D, Wierzbicki P. Rola odpowiedzi immunologicznej w patogenezie chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004; 6: 417-422
  131. Koch TR, Carney JA, Go VL. Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 369-376
  132. Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N. Tumor Necrosis Factor — in Serum of

- Patients with Inflammatory Bowel Disease as Measured by a Highly Sensitive Immuno-PCR. *Clin Chem* 2001; 47: 1297-1301
133. Konturek PC, Konturek SJ. The history of gastrointestinal hormones and the Polish contribution to elucidation of their biology and relation to nervous system. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 83-98
  134. Konturek SJ, Gibiński K. Final conclusions. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 329-330
  135. Konturek SJ, Pawlik WW, Dajani EZ. Brain-gut axis in gastrointestinal system: introductory remarks. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 (Suppl. 4): 3-7
  136. Korolewska-Bochenek, Łazowska-Przeorek I, Szamotulska K, Grzybowska K, Czerwionka-Szaflarska M, Kaczmarek M, Iwańczak F, Ignys I, Albrecht P, Dziechciarz P. Prospektywna ocena epidemiologii nieswoistych zapaleń jelit u dzieci w Polsce w latach 2002-2004 – wyniki wstępne. Materiały Zjazdowe III Kongres Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci, Kraków, wrzesień 2004, 28
  137. Kowiański P, Morys JM, Wojcik S, Dziewiatkowski J, Luczynska A, Spodnik E, Timmermans JP. Neuropeptide-containing neurons in the endopiriform region of the rat: morphology and colocalization with calcium-binding proteins and nitric oxide synthase. *Brain Res* 2004; 996: 97-110
  138. Krenska-Wiącek A, Czerwionka-Szaflarska M. Analiza wpływu stresu na występowanie schorzeń przewodu pokarmowego u dzieci. *Przegl Ped* 1999; 29: 54-56
  139. Kruis W. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 75-78
  140. Kubota Y, Petras RE, Ottaway CA, Tubbs RR, Farmer RG, Focchi C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1242-1251
  141. Kunze WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 117-142
  142. Kucharzik T, Luger N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 483-490
  143. Landowski P. Atypowe postaci przewlekłego nieswoistego zapalenia jelita grubego. W: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A (red.). *Choroby jelita grubego u dzieci*. Wydawnictwo Adam Marszałek, Toruń 2004, 65-79
  144. Larm JA, Gundlach AL. Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 67-71
  145. Lasek W. Układ odpornościowy związany z błonami śluzowymi. In: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W (red.). PWN, Warszawa 2004, 289-297
  146. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 620-625
  147. Lin Z, Sandgren K, Ekblad E. Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine. *Auton Neurosci* 2003; 107: 9-19
  148. Lin Z, Sandgren K, Ekblad E. Increased expression of nitric oxide synthase in cultured neurons from adult rat colonic submucous ganglia. *Auton Neurosci* 2004; 114: 29-38
  149. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol* 2001; 234 (Suppl.): 29-40

150. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1296-1306
151. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
152. Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 4-15
153. Lundgren O. Enteric nerves and diarrhoea. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90: 109-120
154. Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 5: 82-98
155. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
156. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925
157. MacDonald TT, Murch SH, Nicholls SW, Breese EJ. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. *Intestinal cytokines in inflammatory bowel disease and invasive diarrhoea. Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87 (Suppl. 3): 23-26
158. Macfarlane G T, Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol* 1997; 222 (Suppl.): 3-9
159. Majewski M, Bossowska A, Gonkowski S, Wojtkiewicz J, Brouns I, Scheuermann DW, Adriaensen D, Timmermans JP. Neither axotomy nor target-tissue inflammation changes the NOS- or VIP-synthesis rate in distal bowel-projecting neurons of the porcine inferior mesenteric ganglion (IMG). *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 151-152
160. Majewski M, Wojtkiewicz J, Gonkowski S, Bossowska A, Pidsudko Z, Kaleczyc J. NOS-, VIP- or GAL- immunoreactivity disappear from proliferative enteropathy-affected inferior mesenteric ganglion (IMG) neurons supplying porcine descending colon. *Pol J Vet Sci* 2004; 7: 73-75
161. Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF- $\kappa$ B and increases galanin-1 receptor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: 797-804
162. Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Doré J, Pochart P, Seksik P. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 18
163. Matkowskyj KA, Nathaniel R, Prasad R, Weihrauch D, Rao M, Benya RV. Galanin contributes to the excess colonic fluid secretion observed in dextran sulfate sodium murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 408-416
164. Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 (Suppl. 1): 133-136
165. Mazumdar S, Das KM. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 176-181
166. McDonald MP, Crawley JN. Galanin-acetylcholine interactions in rodent memory tasks and Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 1997; 22: 303-317
167. Miampamba M, Sharkey KA. Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 315-329
168. Mirabella N, Squillacioti C, Colitti M, Germano G, Pelagalli A, Paino G. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity and mRNA expression in the duck gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2002; 308: 347-359



169. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; 112: 1169-1178
170. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-147
171. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut*. 2002; 50 (Suppl. 3): 60-64
172. Narkiewicz O, Moryś J. Neuropeptydy. W: *Neuroanatomia czynnościowa i kliniczna*. PZWL, Warszawa 2003, 346-348
173. Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemmann M, Galmiche JP. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 84-90
174. Neunlist M, Barouk J, Michel K, Just I, Oreshkova T, Schemmann M, Galmiche JP. Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: 1049-1055
175. Newman R, Cuan N, Hampartzoumian T, Connor SJ, Lloyd AR, Grimm MC. Vasoactive intestinal peptide impairs leucocyte migration but fails to modify experimental murine colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 411-420
176. Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 216 (Suppl.): 149-159
177. Noguchi M, Hiwatashi N, Liu Z, Toyota T. Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 43: 203-209
178. North RA. 30 years on. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 (Suppl. 1): 1-2
179. Nowak JZ, Zawilska JB. PACAP in avians: origin, occurrence, and receptors-pharmacological and functional considerations. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 467-481
180. Ogata H, Hibi T. Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1107-1113
181. Ogren SO, Schott PA, Kehr J, Misane I, Razani H. Galanin and learning. *Brain Res* 1999 27; 848: 174-182
182. Ogura Y, Bonen D, Inohara N. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606
183. O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 998-1007
184. Ohkusa T, Nomura T, Sato N. The Role of Bacterial Infection in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Intern Med* 2004; 43: 534-539
185. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4: 83-89
186. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298
187. Paradowski L, Mulak A. Wybrane klasyfikacje, skale i wskaźniki aktywności chorób układu pokarmowego *Gastroenterol Pol* 2003; 10: 155-165
188. Pardi DS. Microscopic colitis: an update. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 860-870
189. Pedersen G, Saermark T, Bendtzen K, Brynskov J. Cultures of human colonic epithelial cells isolated from endoscopic biopsies from patients with inflammatory bowel disease. Effect of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on viability, butyrate oxidation and IL-8 secretion. *Autoimmunity* 2000; 32: 255-263
190. Pidsudko Z, Kaleczyc J, Majewski M, Łakomy M, Scheuermann DW, Timmermans JP. Differences in the distribution and chemical coding between

- neurons in the inferior mesenteric ganglion supplying the colon and rectum in the pig. *Cell Tissue Res* 2001; 303: 147-158
191. Pitcher MC, Beatty ER, Cummings JH. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2000; 46: 64-72
  192. Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 77-92
  193. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
  194. Popadiuk S, Landowski P, Korzon M, Renke J, Woźniak M. Grupy karbonylowe w białkach osocza u dzieci z przewlekłym nieswoistym zapaleniem jelit. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2001; 3: 195-198
  195. Potts WJ, Boggs JD, White H. Intestinal obstruction in the newborn infant due to agenesis of the myenteric plexus (congenital megacolon). *Pediatrics* 1952; 10: 253-264
  196. Powell JJ, Harvey RS, Ashwood P, Wolstencroft R, Gershwin ME, Thompson RP. Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J Autoimmun* 2000; 14: 99-105
  197. Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; 18: 1325-1334
  198. Radwan P. Etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit. *Med Sci Rev* 2000; 1: 41-46
  199. Raouf AH, Tsai HH, Parker N. Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin Sci* 1992; 83: 623-626
  200. Reddy P. Interleukin-18: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 405-410
  201. Reif S. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760
  202. Reinshagen M, Flamig G, Ernst S, Geerling I, Wong H, Walsh JH, Eysselein VE, Adler G. Calcitonin gene-related peptide mediates the protective effect of sensory nerves in a model of colonic injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 657-661
  203. Reuter BK, Pizarro TT. Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? *Eur J Immunol* 2004; 34: 2347-2355
  204. Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1571-1579
  205. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389
  206. Rokosz A, Kruszewska D, Rouyan GS. Wykrywanie endotoksyny i enterotoksyny. *Bacteroides fragilis* w podłożu hodowlanym. *Med Dośw Microbiol* 1997; 49: 61-67
  207. Rokosz A, Rouyan GS, Mikołajczyk F. Wytwarzanie enterotoksyny przez szczepy *Bacteroides fragilis* – wpływ klindamycyny. *Med Dośw Mikrobiol* 1997; 49: 153-159
  208. Ruczyński J, Konstański Z, Cybał M, Petruszewicz J, Wójcikowski C, Rekowski P, Kamińska B. Synthesis and biological properties of new chimeric galanin analogue al (1-13)-[ala10, 11]. et-1 (6-21)-nh2. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 273-285
  209. Rühl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 (Suppl. 1): 44-49
  210. Rühl S, Franzke S, Collins M, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 1163-1171

211. Rychlik A, Majewski M, Bigoszewski M, Bossowska A, Depta A, Gonkowski S, Kander M, Kaleczyc J, Nieradka R, Nowicki M, Pidsudko Z. Diarrhea-induced changes in chemical phenotypes of enteric neural structures in the pig are not sufficient to discriminate between the viral and bacterial etiology of the disease. *Bull Vet Inst Puławy* 2002; 46: 187-196
212. Ryżko J. Nieswoiste zapalenia jelit u dzieci. *Przegl Ped* 1999; 29: 288-295
213. Ryżko J. Nieswoiste zapalenia jelit u dzieci. Standardy medyczne. Wybrane zagadnienia gastroenterologii dziecięcej 2002; 4 (Suppl.): 71-79
214. Ryżko J. Leczenie ciężkich postaci nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004; 6: 189-193
215. Sandgren K, Lin Z, Ekblad E. Differential effects of VIP and PACAP on survival of cultured adult rat myenteric neurons. *Regul Pept* 2003; 111: 211-217
216. Sang Q, Young HM. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res* 1996; 284: 39-53
217. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the Enteric Nervous System in Experimental Colitis. *Am Pathol* 1999; 155: 1051-1057
218. Sartor RB. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB (ed.). *Inflammatory bowel disease*. Williams & Wilkins, Baltimore 1999, 153-178
219. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633
220. Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: 919-925
221. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*-2004; 16 (Suppl. 1): 55-59
222. Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil*-2001; 13: 255-264
223. Schott PA, Hokfelt T, Ogren SO. Galanin and spatial learning in the rat. Evidence for a differential role for galanin in subregions of the hippocampal formation. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1386-1403
224. Schulte-Bockholt A, Fink JG, Meier DA, Otterson MF, Telford GL, Hopp K, Koch TR. Expression of mRNA for vasoactive intestinal peptide in normal human colon and during inflammation. *Mol Cell Biochem* 1995; 142: 1-7
225. Schwerbrock NM, Makkink MK, van der Sluis M, Buller HA, Einerhand AW, Sartor RB, Dekker J. Interleukin 10-Deficient Mice Exhibit Defective Colonic MUC2 Synthesis Before and After Induction of Colitis by Commensal Bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 811-823
226. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostic, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120: 622-635
227. Sharkey KA, Kroese ABA. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: Neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Record* 2000; 262: 79-90
228. Sheil B, McCarthy J, O'Mahony L, Bennett MW, Ryan P, Fitzgibbon JJ, Kiely B, Collins J K, Shanahan F. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 2004; 53: 694-700

229. Silva MA, Lopez CB, Riverin F, Oligny L, Menezes J, Seidman EG. Characterization and distribution of colonic dendritic cells in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 504-512
230. Smith BR, Arnott ID, Drummond HE, Nimmo ER, Satsangi J. Disease Location, Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibody, and NOD2/CARD15 Genotype Influence the Progression of Disease Behavior in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 521-528
231. Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao W-J, Vaysse P J-J, Branchek TA, Gerald C, Jones KA. Cloned Human and rat Galanin GALR3 Receptors pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Biol Chem* 1998; 273: 23321-23326
232. Socha J, Madaliński K, Stolarczyk A. Probiotics in gastrointestinal tract diseases and their immunomodulating effects. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2000; 3: 137-140
233. Socha P. Zastosowanie zmiataaczy wolnych rodników w leczeniu chorób przewodu pokarmowego i w leczeniu żywieniowym dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2001; 3: 129-133
234. Sokołowska P, Dejda A, Nowak JZ. Neuroprotective role of PACAP, VIP, and PHI in the central nervous system. *Postepy Hig Med Dosw* 2004; 58: 416-427
235. Stadnicki A, Colman RW. Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2003;51:149-155
236. Stallmach A, Carstens O. Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 213-218
237. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355
238. Sydora BC, Tavernini MM, Wessler A, Jewell LD, Fedorak RN. Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 87-97
239. Szumera M, Landowski P, Kamińska B, Renke J, Korzon M. Zaburzenia mineralizacji kości u dzieci z przewlekłymi chorobami zapalnymi jelit (PZCHJ). In: XXVIII Ogólnopolski Zjazd Pediatrów, Rzeszów, 16-18 czerwca 2005; 56
240. Tack J. Receptors of the enteric nervous system: potential targets for drug therapy. *Gut* 2000; 47 (Suppl. 4): 20-22
241. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1-4
242. Tateishi H, Mitsuyama K, Toyonaga A, Tomoyose M, Tanikawa K. Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion* 1997; 58: 271-281
243. Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald T J, Mutt V. Galanin — a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 1983; 164: 124-128
244. Timmermans JP, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groodt-Lasseel MH. Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol* 1992; 30: 113-122
245. Tixier E, Neunlist M, Boureille A, Galmiche J. Mucosal inflammatory challenges induce IL-8 secretion by enteric neurones: role of IL-1B. *Gut* 2004; 53 (Suppl. VI): 65
246. Todorovic V, Janic B, Koko V, Micev M, Nikolic J A, Ratkovic M, Lepasovic G, Jankovic T, Knezevic-Usaj S, Milicevic Z. Colonic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in ulcerative colitis — a radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 483-488
247. Tomoe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, Holst J J. PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul Pept* 2001; 101: 109-121

248. Tuncel N, Tore F, Sahinturk V, Ak D, Tuncel M. Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock. *Peptides* 2000; 21: 81-89
249. Van der Eijk I, Vlachonikolis G, Munkholm P, Nijman J, Bernklev T, Politi P, Odes S, Tsianos EV, Stockbrugger RW, Russel MG. The role of quality of care in health-related quality of life in patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 392-398
250. Van der Waaij LA, Kroese FGM, Visser A, Nelis GF, Westerveld BD, Jansen P, Hunter JO. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 669-674
251. Vanner S, Macnaughton WK. Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 (Suppl. 1): 39-43
252. Vrontakis ME. Galanin: A Biologically Active Peptide. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2002; 1: 531-541
253. Watanabe T, Kubota Y, Muto T. Substance P containing nerve fibers in rectal mucosa of ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 718-725
254. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2630-2633
255. Winesett M. Inflammatory Bowel Disease in children and adolescents. *Paediatric Ann* 1997; 26: 227-234
256. Wood JD. 2 Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 2004; 127: 635-657
257. Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45 (Suppl. 2): 1-16
258. Wrenn CC, Kinney JW, Marriott LK, Holmes A, Harris AP, Saavedra MC, Starosta G, Innerfield CE, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Wenk GL, Crawley JN. Learning and memory performance in mice lacking the GAL-R1 subtype of galanin receptor. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1384
259. Wu S, Powell J, Mathioudakis N, Kane S, Fernandez E, Sears CL. Bacteroides fragilis Enterotoxin Induces Intestinal Epithelial Cell Secretion of Interleukin-8 through Mitogen-Activated Protein Kinases and a Tyrosine Kinase-Regulated Nuclear Factor-B Pathway. *Infect Immun* 2004; 72: 5832-5839
260. Wypych J, Kmiec Z, Kryszewski A, Dobrzańska Z, Banach P, Korzon M, Kamińska B, Wegner J. IL-18 and IL-10 mucosal gene expression and serum levels in inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51 (Suppl. III): 2993
261. Yamamoto H, Kuwahara A, Fujimura M, Maeda T, Fujimiya M. Motor activity of vascularly perfused rat duodenum. 2. Effects of VIP, PACAP27 and PACAP38. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 235-241
262. Yamamoto H, Morise K, Kusugami K, Furusawa A, Konagaya T, Nishio Y, Kaneko H, Uchida K, Nagai H, Mitsuma T, Nagura H. Abnormal neuropeptide concentration in rectal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996; 31: 525-532
263. Yanaihara N, Mochizuki T, Takatsuka N, Iguchi K, Sato K, Kakuyama I, Li M, Yanaihara C. Galanin analogues: agonist and antagonist. *Regul Pept* 1993; 46: 93-101
264. Zdrojewicz Z, Sowińska E. Znaczenie galaniny w procesach fizjologicznych i patologicznych w organizmie człowieka. *Postepy Hig Med Dosw* 2000; 54: 819-834
265. Zdrojewicz Z, Sztuka-Pietkiewicz A, Pietkiewicz W. Rola wazoaktywnego peptydu jelitowego w organizmie. *Wiad Lek* 1999; 52: 402
266. Zigmond RE. Can galanin also be considered as growth-associated protein 3.2? *Trends Neuroscience* 2001; 24: 494-496

