

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVIII
2008
SUPPLEMENT 1**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Anna Liberek

**ROLA TRANSFORMUJĄCEGO CZYNNIKA
WZROSTU $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) I JEGO POLIMORFIZMU
GENOWEGO W ETIOPATOGENEZIE
I PRZEBIEGU KLINICZNYM PRZEWLEKŁYCH STANÓW
ZAPALNYCH UKŁADU POKARMOWEGO U DZIECI**

*Role of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)
and its gene polymorphism in the pathogenesis
and clinical course of chronic inflammatory diseases
of digestive system in children*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Pediatrii Gastroenterologii Hepatologii i Żywienia Dzieci
Kierownik Kliniki: dr hab. med. Barbara Kamińska

GDAŃSK 2008

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

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

Pragnę podziękować Wszystkim,
którzy okazali mi pomoc oraz życzliwość
i przyczynili się do powstania niniejszej pracy

Praca finansowana
w ramach projektu badawczego
MNiSW Nr 2PO5E 125 27

Spis treści

OBJAŚNIENIE UŻYTYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Budowa i aktywność biologiczna TGF- β	11
1.2. Rola TGF- β 1 w patogenezie wybranych stanów chorobowych	13
1.3. Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit i przewlekłych zapaleń wątroby	14
1.4. Transformujący czynnik wzrostu TGF- β 1 w patologii wieku rozwojowego.....	22
1.5. Ocena transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1 w moczu w niektórych stanach chorobowych.....	24
1.6. Polimorfizmy genu kodującego transformujący czynnik wzrostu TGF- β 1.....	25
2. CEL PRACY	28
3. PACJENCI I METODY	29
3.1. Charakterystyka badanych.....	29
3.2. Metodyka badań.....	32
4. WYNIKI.....	48
4.1. Charakterystyka badanych.....	48
4.2. Stężenie transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1 w osoczu	61
4.3. Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 badany w bioptatach błony śluzowej jelita i wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).....	74
4.4. Stężenie TGF- β 1 w osoczu a poziom mRNA genu <i>TGF-β1</i> w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby	94
4.5. Poziom mRNA genu <i>TGF-β1</i> a wyniki badania endoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ	96
4.6. Badanie immunohistochemiczne (IHC) na obecność TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby.....	99

4.7. Wyniki badania immunohistochemicznego (IHC) na obecność TGF- β 1 a stężenie TGF- β 1 w osoczu w badanych grupach dzieci.....	102
4.8. Stężenie TGF- β 1 w osoczu, poziom mRNA genu <i>TGF-β1</i> oraz nasilenia reakcji IHC na obecność TGF- β 1 a aktywność zapalna oraz nasilenie włóknienia w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW	106
4.9. Analiza polimorfizmów genu <i>TGF-β1</i>	108
4.10. Analiza wieloczynnikowa	116
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ	122
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	127
6.1. Wprowadzenie	127
6.2. Charakterystyka grupy badanej	130
6.3. Transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1) oraz inne wybrane cytokiny w przewlekłych zapaleniach wątroby	131
6.4. Transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1) oraz inne wybrane cytokiny w nieswoistych zapaleniach jelit.....	138
6.5. Polimorfizmy genu kodującego TGF- β 1 oraz innych wybranych cytokin.....	145
6.6. Wartości referencyjne transformującego czynnika wzrostu- β 1 we krwi (w osoczu lub w surowicy)	150
6.7. Podsumowanie	151
7. WNIOSKI.....	156
8. STRESZCZENIE	157
9. SUMMARY	160
10. PIŚMIENNICTWO.....	163

Objaśnienie użytych skrótów

- AFP – alfa-fetoproteina (*alpha-fetoprotein*)
- AIH – autoimmunologiczne zapalenie wątroby (*autoimmune hepatitis*)
- ALT/AST – aminotransferaza alaninowa/asparaginianowa (*alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase*)
- CD – choroba Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's Disease*)
- CRP – białko C-reaktywne (*C-reactive protein*)
- DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy (*deoxyribonucleic acid*)
- ECM – macierz (substancja) pozakomórkowa (*extracellular matrix*)
- EOS – granulocyty kwasochłonne (*eosinophiles*)
- Fe – żelazo (*ferrum*)
- FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor*)
- HBV – *Hepatitis B virus* (w pracy również oznaczenie podgrupy chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B)
- HCC – rak wątrobowokomórkowy (*carcinoma hepatocellulare*)
- HCV – *Hepatitis C virus* (w pracy również oznaczenie podgrupy chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C)
- HGB – hemoglobina (*haemoglobin*)
- HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*)
- HLA – antygeny ludzkich leukocytów (*human leukocyte antigens*)
- IFN – interferon (*interferon*)
- IHC – reakcja immunohistochemiczna (*immunohistochemical staining*)
- IL – interleukina (*interleukin*)
- K (C) – grupa kontrolna (*control group*)
- Komórka K – komórka zabójca (*killer cell*)
- Komórka NK – naturalna komórka cytotoksyczna N (*natural killer cell*)
- LB – limfocyt B (*B lymphocyte*)
- Limf – limfocyty (*lymphocytes*)
- Limfocyt Th – limfocyt T pomocniczy (*T helper lymphocyte*)
- Limfocyt Ts – limfocyt T supresorowy (*T suppressor lymphocyte*)
- LT – limfocyt T (*T lymphocyte*)
- Max – maximum (*maximum*)
- MHC – główny układ zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*)
- Min – minimum (*minimum*)
- Mono – monocyty (*monocytes*)
- mRNA – informacyjny (matrycowy) kwas rybonukleinowy (*messenger ribonucleic acid*)
- m.ż. – miesiąc życia (*month of life*)
- Neutro – granulocyty obojętnochłonne (*neutrophiles*)

- N – liczba badanych (*number of patients*)
- NS – wartość nieistotna statystycznie (*statistically insignificant*)
- NZJ (*IBD*) – nieswoiste zapalenia jeli (*inflammatory bowel disease*)
- PAF – czynnik aktywujący płytki (*platelet activating factor*)
- PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (*polymerase chain reaction*)
- PDGF – płytkotwórczy czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor*)
- PF4 – czynnik płytkowy 4 (*platelet factor 4*)
- PLT – liczba płytek krwi (*platelet count*)
- pz (*bp*) – par zasad (*base pair*)
- PZW (*Ch. h.*) – przewlekłe zapalenia wątroby (*chronic hepatitis*)
- Real Time PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real Time polymerase chain reaction*)
- r. ż. – rok życia (*year of life*)
- SD – odchylenie standardowe (*standard deviation*)
- Smad – układ białek cytoplazmatycznych biorących udział w przekazywaniu impulsu powstałego przez związanie się TGF- β z receptorem (*Smad protein*)
- TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor*)
- TGF- β* – gen kodujący transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor gene*)
- TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α*)
- UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*)
- VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (*vascular endothelial growth factor*)
- WBC – liczba białych krwinek (*white blood count*)

1. Wstęp

Wśród czynników zaangażowanych w utrzymanie homeostazy immunologicznej w organizmie i związane z tym procesy wzrostu i dojrzewania, istotną rolę przypisuje się transformującemu czynnikowi wzrostu – beta ($TGF-\beta$ – *transforming growth factor*). Ta odkryta około 20 lat temu cytokina nadal jest przedmiotem licznych badań doświadczalnych i klinicznych. Jej znaczenie wynika przede wszystkim z bardzo zróżnicowanego i wielokierunkowego działania zarówno miejscowego, jak i ogólnoustrojowego [140].

1.1. Budowa i aktywność biologiczna $TGF-\beta$

Poznano pięć izoform $TGF-\beta$. Trzy z nich ($TGF-\beta_1$, 2, 3) występują u ssaków, w tym u ludzi. Każda z izoform jest kodowana przez odrębne geny znajdujące się na różnych chromosomach, lecz wszystkie wykazują podobną aktywność, są homologiczne w 60-80% oraz indukują w dużym stopniu podobne efekty biologiczne. Szczególnie bogatym źródłem $TGF-\beta$ są płytki krwi, aczkolwiek produkowany jest on także przez wiele innych komórek (komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, monocyty, makrofagi, limfocyty, komórki tkanki łącznej oraz komórki nowotworowe) [75, 263].

U ludzi gen kodujący $TGF-\beta_1$ jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 19 (pozycja 19q13.2) [46, 67]. Ma on wielkość ponad 23,5 kb i składa się z 7 eksonów, które kodują prekursorowe białko składające się z 390 aminokwasów. Z białka tego, po cięciu proteolitycznym, powstaje następnie aktywne białko składające się ze 112 aminokwasów [46].

Rejon promotorowy genu *TGF- β_1* zawiera 2 miejsca dla inicjacji transkrypcji, a jego cechą charakterystyczną jest brak w obrębie części rdzeniowej typowej sekwencji bogatej w parę AT (adenina, tymina – tzw. *TATA box*) oraz sekwencji CAAT (cytozyna, adenina, adenina, tymina – tzw. *CAAT box*) [112]. Transformujący czynnik wzrostu β jest homodimerem składającym się z dwóch białek o masie cząsteczkowej 12,5 kDa połączonych wiązaniem sulfhydrylowym w białko o masie cząsteczkowej 25 kDa. Może przyjmować też formę heterodimeru: $TGF-\beta_{1,2}$ i $TGF-\beta_{2,3}$ [22,75,140]. Transformujący czynnik wzrostu β jest syntetyzowany jako prekursor polipeptydowy, zawierający pro-region i właściwy $TGF-\beta_1$. Przed wydzieleniem z komórki jest odszczepiany od pro-regionu, lecz nadal pozostaje związany z nim niekowalencyjnie. Po uwolnieniu z komórki jest w formie nieczynnego kompleksu (*Latent TGF- β complex*), w którym jest połączony niekowalencyjnie z białkami LAP (*Latent Associated Protein*) poprzez grupę dwusiarczkową oraz kowalencyjnie z białkami LTBP (*Latent TGF- β Binding Protein*). Białko LTBP jest składnikiem prawidłowej macierzy pozakomórkowej ECM (*extracellular matrix*) i jest konieczne zarówno dla wydzielania, jak i magazynowania $TGF-\beta_1$.

Podobnie jak sama cytokina, również LTBP występuje w 3 zróżnicowanych izoformach (LTBP 1, 2, 3). We krwi $TGF-\beta_1$ obecny jest w formie nieaktywnej o okresie półtrwania około 90 minut. W postaci aktywnej $TGF-\beta$ jest eliminowany z krążenia w ciągu kilku (około 3) minut. W związku z tym, że LAP i LTBP maskują epitopy $TGF-\beta_1$, a czas półtrwania aktywnej formy $TGF-\beta_1$ jest bardzo krótki, ani we krwi

obwodowej, ani w tkankach praktycznie nie można wykryć metodą bezpośrednią obecności aktywnego TGF- β 1 [71, 75].

Wstępnym, nieodzownym etapem aktywacji nieczynnego TGF- β jest jego związanie z białkiem ECM. W procesach tych uczestniczy tkankowa transglutaminaza (tTG). Do uwolnienia aktywnego TGF- β dochodzi poprzez enzymatyczną proteolizę jego nieaktywnego kompleksu, w czym biorą udział plazmina, trombina i katepsyna D bądź przez działanie takich czynników fizycznych, jak wzrost temperatury czy zakwaszenie środowiska [122, 178, 183, 187].

Na powierzchni komórek reagujących na transformujący czynnik wzrostu istnieją trzy typy białek (receptorów) współuczestniczących w wiązaniu tej cytokiny. Określa się je jako typ I, II i III receptora TGF- β 1. Receptory te są białkami o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 53kDa (receptor typu I) i 73 kDa (receptor typu II). Wewnątrzkomórkowe fragmenty obu tych receptorów są kinazą serynowo-treoninową. Receptor III natomiast, zwany też betaglikanem, zakotwiczony jest w błonie komórkowej swoją komponentą cukrową, posiadającą bardzo krótką domenę cytoplazmatyczną, niewykazującą zdolności przenoszenia sygnału. TGF- β przyłącza się do receptora III, który prezentuje go receptorowi II (lub bezpośrednio do receptora II). Receptory typu II ulegają dimeryzacji i wiążą TGF- β , a następnie tworzą tetrametr, przyłączając dwa receptory typu I w celu utworzenia kompleksu sygnałowego. Połączenie receptorów I i II powoduje fosforylację reszt serynowych domeny glicynowo-serynowej receptora typu I doprowadzając ostatecznie do fosforylacji czynników transkrypcyjnych z rodziny Smad [71, 75, 202, 203].

Związanie TGF- β z receptorem staje się źródłem impulsu przekazywanego w kierunku jądra komórkowego właśnie za pośrednictwem znajdującego się w cytoplazmie komórki specyficznego układu białek Smad (Smad1-Smad5). Przewodzony tą drogą sygnał wpływa na fazę transkrypcji określonego genu, a także stabilizuje powstający mRNA, ułatwiając jego translację [71, 113, 140]. Istnieją jednak mechanizmy funkcjonujące antagonistycznie, blokujące przewodzenie sygnału przez Smad1-5. Działają tak białka z tej samej rodziny, Smad6 i Smad7 [173, 184].

Wśród złożonych właściwości transformującego czynnika wzrostu – TGF- β 1 można wyodrębnić dwie główne sfery jego aktywności biologicznej.

Pierwsza z nich, to wpływ na procesy proliferacji i różnicowania komórek. Wiąże się z to udziałem TGF- β w regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów, czy też w przebudowie kości, a także w powstawaniu nowotworów i generowaniu zmian histopatologicznych, zwłaszcza włóknienia w przebiegu przewlekłych stanów zapalnych [19, 62, 113, 140, 234].

Stymuluje on wzrost komórek pochodzenia mezenchymalnego, hamuje natomiast proliferację komórek nabłonkowych i krwiotwórczych oraz śródbłonna [50].

W efekcie przyczynia się do angiogenezy i chondrogenyzy oraz pobudzenia osteoblastów. W obrębie poszczególnych tkanek i narządów wpływ TGF- β polega na wspomaganiu procesów mających na celu regenerację uszkodzeń pourazowych bądź chorobowych. Stymuluje on produkcję składników ECM, zwłaszcza fibronektyny, kolagenu i proteoglikanów. W warunkach chorobowych może to prowadzić do wystąpienia patologicznego włóknienia. W wątrobie wywołuje także transformację komórek

gwiazdzistych (lipocyty, komórki Ito) do miofibroblastów, a w obrębie przewodu pokarmowego stymuluje znajdujące się tam komórki mięśni gładkich do produkcji kolagenu. W przypadku uszkodzenia błony śluzowej jelita, TGF- β przyspiesza gojenie – wprawdzie hamuje proliferację nabłonka, jednak jednocześnie pobudza jego migrację z miejsc sąsiadujących, doprowadzając w krótkim czasie (godziny) do pokrycia ubytku dojrzałymi już czynnościowo komórkami nabłonkowymi [50, 62, 263].

Druga podstawowa aktywność biologiczna TGF- β 1 to działanie immunomodulacyjne. Wykazano, że limfocyty B (LB) dysponują receptorami o wysokim powinowactwie dla TGF- β . Pod jego wpływem ulega supresji proliferacja LB oraz produkcja immunoglobulin klasy G i M. Cytokina ta wzmaga natomiast różnicowanie się LB do komórek produkujących immunoglobulinę klasy A [111, 140, 147]. W doświadczeniu *in vitro* wykazano, że TGF- β obniża produkcję interleukiny-12 (IL-12) przez makrofagi, a tym samym ogranicza odpowiedź immunologiczną zarówno typu komórkowego (Th1) jak i humoralnego (Th2) [248]. Przy udziale komórek NK, TGF- β nasila immunosupresyjne działanie efektorowych komórek CD8 [277]. Istniejące na powierzchni błony śluzowej jelita limfocyty T, CD4(+) – LTh3, produkując TGF- β , przyczyniają się poprzez aktywną supresję do rozwoju tolerancji pokarmowej [140, 198]. Ograniczając apoptozę aktywnych limfocytów T (LT), TGF- β wydłuża czas ich przeżycia, generując tym samym długotrwałą pamięć immunologiczną [33].

1.2. Rola TGF- β 1 w patogenezie wybranych stanów chorobowych

Jak wspomniano, TGF- β 1 jest niezbędny dla zachowania homeostazy immunologicznej. Brak bądź zmniejszona jego aktywność biologiczna prowadzi do następstw chorobowych. Długotrwałe zaburzenia immunoregulacji są bowiem podstawowym elementem etiopatogenetycznym wielu schorzeń [33, 107, 184, 277]. Poznano już wiele czynników zarówno genetycznie uwarunkowanych, jak i środowiskowych, modyfikujących wytwarzanie, aktywację i efektywność działania TGF- β .

Szereg chorób może wynikać z niedostatecznej lub z nadmiernej aktywności biologicznej TGF- β 1. Wiąże się to z jego opisanym wcześniej wpływem zarówno na reakcje immunologiczne, jak i na procesy regeneracji oraz przebudowy tkanek. Szczególny punkt zainteresowania stanowią przewlekłe stany zapalne, w tym przede wszystkim nieswoiste zapalenia jelit oraz przewlekłe zapalenie wątroby. Przeprowadzone dotychczas badania doświadczalne i kliniczne potwierdzają znaczący udział TGF- β 1 w patogenezie tych chorób [22, 33, 36, 62, 89, 107, 184, 278].

Obecnie istnieje pełna zgodność poglądów, że nagromadzenie TGF- β w wątrobie jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za jej włóknienie u chorych z przewlekłymi zapaleniami wątroby (PZW), przede wszystkim o etiologii wirusowej (HBV, HCV) [31, 101, 110, 164].

Podobnie w przypadku przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) powstanie zmian bliznowatych w jelicie wiąże się m.in. właśnie z działaniem tej cytokiny, nasilającym produkcję włókien. Nadal jednak nie wyjaśniono ostatecznie – czy zwiększenie zawartości TGF- β 1 w zmienionej zapalnie tkance nie jest jedynie odpowiedzią

na dokonane już jej uszkodzenie przez toczący się w niej proces chorobowy. Wiadomo bowiem, że właśnie uszkodzenie tkanki, obok innych czynników, jest istotnym bodźcem prowadzącym do aktywacji genu kodującego TGF- β 1 i zwiększenia miejscowej ekspresji tej cytokiny [108, 165].

Nie można wykluczyć, że przyczyną umożliwiającą rozwój przewlekłego stanu zapalnego jest pierwotnie deficyt aktywności biologicznej TGF- β . Mogą za tym przemawiać wyniki niektórych prac doświadczalnych. U myszy pozbawionych genu dla TGF- β zaraz po urodzeniu rozwijają się wielonarządowe zmiany zapalne i martwicze, związane z nadmierną aktywnością cytokin zaangażowanych w odpowiedź typu komórkowego, która fizjologicznie jest hamowana przez TGF- β [73, 149]. Za taką sugestią mogą również przemawiać nieliczne wprawdzie, ale zgodne w wymowie doniesienia pediatryczne. Wykazano w nich bowiem niezmienną lub obniżoną ekspresję TGF- β 1 w jelicie u dzieci z enteropatią w przebiegu choroby trzewnej [141], alergii pokarmowej [36], a także u noworodków z NEC (martwicze zapalenie jelit – *enterocolitis necroticans*) [65] oraz u młodocianych z NZJ [275]. Wiadomo również, że w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C u dzieci wyjątkowo rzadko dochodzi do nasilonego włóknienia wątroby [136]. Dobrze z tą obserwacją koresponduje stwierdzenie obniżonej zawartości TGF- β 1 w osoczu u dzieci z przewlekłymi chorobami wątroby [210].

1.3. Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit i przewlekłych zapaleń wątroby

Zdecydowanie najwięcej danych z piśmiennictwa podkreśla związek etiopatogenetyczny TGF- β 1 z przewlekłymi procesami zapalnymi w obrębie układu pokarmowego – z nieswoistymi zapaleniami jelit (NZJ) i przewlekłym zapaleniem wątroby (PZW) [1, 7, 14, 29, 45, 104, 136, 157, 182, 266, 271].

1.3.1. Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ)

Kliniczną manifestacją przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) są najczęściej: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis* – UC) i choroba Leśniowskiego-Crohn'a (*Crohn's disease* – CD).

Są to schorzenia o niewyjaśnionej ostatecznie etiologii, występujące zwykle u ludzi młodych, między 20 a 40 rokiem życia. Jednak około 15 do 20% przypadków rozpoczyna się już u młodzieży, a nawet u dzieci. W ostatnich latach zwraca uwagę tendencja do występowania objawów choroby u coraz młodszych dzieci [95, 213].

Jak wspomniano, etiologia NZJ nie jest w pełni wyjaśniona, jednak wśród czynników etiologicznych wymienia się m.in.: czynniki genetyczne, infekcyjne, immunologiczne, metaboliczne oraz udział reaktywnych form tlenu (RFT). Podkreśla się również niewątpliwy udział czynników środowiskowych, dietetycznych czy też predyspozycji psychicznej [3, 20, 57, 90, 174, 227, 237]. Ujawnienie się schorzenia oraz dalszy jego przebieg kliniczny jest wypadkową wzajemnego oddziaływania tzw. czynników prozapalnych, protekcyjnych oraz regulujących homeostazę błony śluzowej jelita. Do podstawowych czynników prozapalnych (agresywnych) zalicza się: bakterie jelitowe, kwasy żółciowe, enzymy trawienne, lipopolisacharydy oraz peptydoglikany. Wśród

elementów ochronnych wymienia się m.in.: nieprzepuszczalną barierę śluzówkową jelita, immunoglobuliny sekrecyjne, śluz jelitowy, niektóre prostaglandyny, interleukiny, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, somatostatynę, kortyzol i glutaminę. Za elementy modyfikujące homeostazę błony śluzowej jelita uznawane są: genetyczne uwarunkowania odpowiedzialne za immunoregulację i czynność bariery śluzówkowej oraz wspomniane wcześniej czynniki środowiskowe, takie jak: dieta, stres, palenie tytoniu czy stosowane leki [2, 38].

Wydaje się, że aspekt genetyczny odgrywa istotną rolę w występowaniu i prawdopodobnie także w przebiegu schorzenia. Przemawia za tym m.in. zróżnicowanie częstości występowania NZJ wśród przedstawicieli różnych ras (przedstawiciele rasy kaukaskiej chorują kilka razy częściej niż rasy czarnej). Według niektórych autorów w populacji żydowskiej ryzyko rozwoju NZJ jest nawet 2 do 9 razy wyższe niż u przedstawicieli innych grup etnicznych zamieszkujących te same obszary geograficzne. Najwięcej przypadków NZJ notuje się w krajach skandynawskich, Europie Zachodniej oraz w Ameryce Północnej. Ponadto zwraca uwagę częstsze występowanie powyższych chorób (nawet o 30%) wśród krewnych pierwszego stopnia oraz u bliźniąt jednojajowych [20]. Wielu autorów podkreśla, że rodzinne występowanie jest częstsze w przypadku CD niż w UC [87, 192]. Na podstawie badań ostatnich lat wiadomo, że u pacjentów z UC częściej występują pewne antygeny zgodności tkankowej (np.: HLA-DR2, DR9, DRB1 0103). Stwierdzenie obecności wymienionych antygenów zgodności tkankowej może być dodatkowym potwierdzeniem rozpoznania w niektórych szczególnie trudnych sytuacjach klinicznych. Stwierdzono również, że wśród HLA klasy II u chorych z UC rzadziej niż w ogólnej populacji notuje się występowanie HLA-DR4, sugerując jego ochronne działanie zmniejszające ryzyko rozwoju tej choroby [121, 224, 240, 256]. W przypadku CD nie udowodniono tak ścisłej zależności ryzyka rozwoju schorzenia z występowaniem konkretnych antygenów zgodności tkankowej. Pewne obserwacje wskazują na istnienie takiego związku z HLA-B44 (HLA klasy I) oraz HLA-DR4 (HLA klasy II) [20, 223, 224, 238, 261].

Wykazano ponadto związek między pewnymi regionami chromosomów 2 i 6 a występowaniem UC oraz między regionami położonymi w chromosomach 3, 7 i 12 a skłonnością do CD. W przypadku tej postaci NZJ podkreśla się związek z mutacją genu NOD2 na chromosomie 16. Występowanie powyższej mutacji w grupie chorych z UC nie jest częstsze niż w populacji zdrowej, co może potwierdzać pogląd, że UC i CD są jednak niezależnymi jednostkami chorobowymi [261].

Analizując udział reaktywnych form tlenu (RFT) w etiopatogenezie NZJ, a szczególnie UC, podkreśla się m.in. ich udział w degradacji mucyny, przez co ułatwione jest wnikanie produktów bakteryjnych do blaszki właściwej i zapoczątkowanie odpowiedzi zapalnej. Dodatkowym dowodem świadczącym o udziale RFT w patogenezie tych schorzeń jest ustępowanie bądź znaczne zmniejszenie nasilenia objawów choroby pod wpływem sulfasalazyny i kwasu 5-aminosalicylowego, które są silnymi zmiataczami wolnych rodników [276].

Jak wspomniano, również pewne czynniki środowiskowe mogą odgrywać rolę w patogenezie i przebiegu NZJ. Wśród nich wymienia się m.in. dietę (sacharozę, zawartość kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3) oraz palenie tytoniu [38, 159].

Związek między paleniem tytoniu a występowaniem i przebiegiem NZJ jest niewątpliwy, lecz jego mechanizm nadal nie jest ostatecznie wyjaśniony. Wiadomo jednak, że palenie tytoniu prowadzi m.in.: do wzrostu stężenia endogennych kortykosterydów, wpływa na liczbę i rodzaj krążących limfocytów (wzrost liczby komórek cytotoksycznych i spadek liczby komórek pomocniczych), powoduje zwiększoną przepuszczalność ścian jelit oraz wzrost stężenia wolnych rodników [38].

Obserwacje kliniczne wskazują na niekorzystne działanie palenia tytoniu na przebieg CD w odróżnieniu od UC, gdzie pod jego wpływem niejednokrotnie dochodzi do ustąpienia bądź zmniejszenia nasilenia objawów choroby. W badaniach *in vivo* wykazano, że nikotyna ma hamujący wpływ na funkcję komórek Th2, które dominują w UC, natomiast nie ma takiego działania na efekt komórek Th1 przeważających w CD [38, 150].

Na podstawie obserwacji związanych z częstszym występowaniem autoprzeciwciał antyleukocytarnych (przede wszystkim pANCA) uważa się, że UC w odróżnieniu od CD można ewentualnie zaliczać do grupy chorób związanych z autoimmunizacją. Wykazano bowiem, iż powyższe autoprzeciwciała występują aż u 70% pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, a jedynie u około 20% chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna [20].

Coraz więcej danych wskazuje na to, że najistotniejszym elementem w etiopatogenezie CD i UC jest zmieniona aktywność biologiczna cytokin w błonie śluzowej jelita, co w efekcie prowadzi najprawdopodobniej do zaburzeń immunoregulacji, przede wszystkim do deficytu lub zmniejszenia aktywności cytokin wywierających wpływ supresyjny [118, 208, 213, 237]. W warunkach fizjologicznych, wobec stałej, nasilonej stymulacji antygenami, utrzymywanie homeostazy w przewodzie pokarmowym oznacza konieczność zachowania stanu czynnościowej równowagi między czynnikami pro- i przeciwzapalnymi, w tym także między cytokinami pro- i przeciwzapalnymi. U chorych z NZJ występują przede wszystkim zaburzenia w populacji limfocytów T, obserwuje się wzmoczoną miejscową odpowiedź immunologiczną oraz nasiloną produkcję prozapalnych cytokin (IL-1, TNF- α , TNF- β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ) [118, 208, 213, 237].

Wśród cytokin przeciwzapalnych odgrywających istotną rolę w patogenezie NZJ wymienia się przede wszystkim IL-10, określaną jako inhibitor syntezy cytokin (hamuje syntezę wielu cytokin poprzez działanie na komórki Th1). Inne cytokiny o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym to m.in: TGF- β , interleukina 11 (IL-11), interferon alfa i beta (IFN- α , IFN- β) [58, 118, 208, 226].

U chorych z NZJ ma również miejsce nasilona proliferacja limfocytów Th (limfocyty T – pomocnicze), przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby limfocytów Ts (limfocyty T – supresorowe). Skutkuje to najprawdopodobniej nadmierną reakcją na własne bądź inne znane antygeny. Opisanymi zjawiskami tłumaczy się między innymi współistnienie u niektórych pacjentów kilku schorzeń o podłożu autoimmunologicznym (np. UC, CD, PSC, AIH) [20, 208, 213, 237].

Podsumowując należy podkreślić, że większość badaczy uważa, iż w UC wzrasta przede wszystkim produkcja IL-4, IL-5 i IL-10 (produkowanych przez komórki Th2), natomiast w CD – IL-2, IFN- γ (produkowanych przez komórki Th1) oraz TNF- α [45]. Obserwacje powyższe wskazują nowe kierunki w terapii NZJ, polegające na hamo-

waniu aktywności niektórych cytokin (np. przeciwciała monoklonalne przeciw TNF- α w CD) [3, 51, 126, 213].

Należy ponadto zaznaczyć, że intensywna, także w warunkach fizjologicznych, wymiana nabłonka jelitowego wymaga ciągłego sterowania procesami proliferacji komórek i syntezy macierzy pozakomórkowej. Spośród cytokin uczestniczących w tych zjawiskach jako jedną z pierwszoplanowych wymienia się także TGF- β 1.

Cytokina ta w znaczącym stopniu przyczynia się do wspomaganiania mechanizmów obronnych, nie dopuszczając do destrukcji śluzówki jelita. Jej znaczenie w przewodzie pokarmowym wydaje się dodatkowo podkreślać fakt, że właśnie wśród obecnych w jelicie subpopulacji limfocytów T znajdują się limfocyty TCD4+ o fenotypie LTh3, które produkują TGF- β 1 oraz że ekspresję TGF- β stwierdza się głównie w miejscach bardziej eksponowanych na stymulację antygenową, a więc w obrębie kosmków jelitowych, a nie krypt [81].

Istnieją zatem podstawy by sądzić, iż pozbawienie przewodu pokarmowego fizjologicznej funkcji TGF- β może być przyczyną zwiększonej podatności na rozwój zaburzeń leżących u podstaw patogenezy NZJ. Wskazują na to m.in. wyniki niektórych prac doświadczalnych. Wykazano, że brak receptorów dla TGF- β powoduje wzrost ekspresji antygenów układu MHC klasy II i nasilenie reakcji immunologicznej ze zwiększoną produkcją autoprzeciwciał, a w końcowym efekcie prowadzi do głębokiego uszkodzenia śluzówki jelita [9].

W celu określenia ewentualnego udziału TGF- β 1 w patogenezie CD i UC przeprowadzono szereg badań klinicznych oraz doświadczalnych. Analizowano zawartość TGF- β 1 w osoczu, a także ekspresję tej cytokiny i jej receptorów oraz poziom mRNA genu kodującego TGF- β w błonie śluzowej jelita u chorych z NZJ. Wyniki przeprowadzonej większości tych badań wydają się potwierdzać przyjęte założenia, a rozbieżności dotyczą jedynie stopnia zaangażowania poszczególnych izoform TGF- β . U chorych z NZJ stwierdzono w błonie śluzowej jelita zarówno zwiększoną ekspresję samego TGF- β , jak i jego receptorów (TGF- β R I-III) [49]. Według niektórych autorów wzrost ten dotyczył poszczególnych izoform w różnym stopniu i miał miejsce jedynie w aktywnej fazie choroby [108, 165]. Wykazano również korelację między poziomem mRNA genu kodującego TGF- β w błonie śluzowej jelita a stopniem nasilenia odczynu zapalnego [7].

Natomiast wyniki badań zawartości TGF- β w osoczu są w dużym stopniu niejednoznaczne. Z jednej strony wykazano, że w schorzeniach tych wzrasta poziom tej cytokiny jedynie w stopniu statystycznie nieznamienne [239], jednak według innych doniesień, u chorych z UC zawartość TGF- β 1 w osoczu jest znamienne podwyższona i wykazuje istotną statystycznie, dodatnią korelację ze stopniem uszkodzenia błony śluzowej jelita [271]. Być może, że cytowane wyniki sugerują raczej wtórny udział TGF- β w procesie regeneracji (naprawy) tkanek uszkodzonych w następstwie procesów immunologicznych w przebiegu zapalenia jelita bądź też, w mającym miejsce później, procesie włóknienia. Wydaje się jednak, że nie można na ich podstawie jednoznacznie wnioskować, że TGF- β uczestniczy w generowaniu wstępnej fazy tych zaburzeń. Zagadnienie to wymaga dalszych, szerokich badań przeprowadzonych w dużych grupach chorych.

1.3.2. Przewlekłe zapalenie wątroby (PZW)

Kolejnym przewlekłym stanem zapalnym układu pokarmowego, stosunkowo często spotykanym w pediatrii, są przewlekłe zapalenia wątroby (PZW). Stanowią one nadal poważny i trudny problem kliniczny, wynikający przede wszystkim z ryzyka ewolucji zmian zapalnych w kierunku marskości, a także zdecydowanie zwiększonego niebezpieczeństwa wystąpienia na tym tle proliferacji nowotworowej (*carcinoma hepatocellulare*). Według definicji *Desmeta* o przewlekłym zapaleniu wątroby mówimy wówczas, gdy objawy kliniczne oraz odchylenia w badaniach biochemicznych świadczące o uszkodzeniu tego narządu utrzymują się minimum 6 miesięcy. Towarzyszą temu charakterystyczne zmiany w badaniu histopatologicznym wycinka wątroby [44, 47].

Szereg czynników etiologicznych może wywołać PZW. W diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę przede wszystkim czynniki infekcyjnej, ale również zaburzenia metaboliczne (np. niedobór alfa-1-antytrypsyny, choroba Wilsona) czy immunologiczne (np. autoimmunologiczne zapalenie wątroby – AIH, pierwotnie stwardniające zapalenie dróg żółciowych – PSC). Do chwili obecnej nadal ważnym problemem są przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby typu C oraz B. Ryzyko wystąpienia stanu przewlekłego zapalenia w przypadku zakażenia HBV wyraźnie związane jest z niedojrzałością układu immunologicznego. Wynosi ono bowiem około 90% u noworodków, 40-70% u niemowląt i 10-40% u dzieci między czwartym a szóstym rokiem życia [103, 138, 175].

W ostatnich latach, w związku z wprowadzeniem w Polsce obowiązkowych szczepień przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, znacząco spada liczba dzieci i młodzieży zakażonych tym drobnoustrojem [103, 197]. Również rutynowe podawanie erytropoetyny chorym z przewlekłą niewydolnością nerek leczonym metodami nerkozastępczymi, znamienne zmniejszyło liczbę zakażonych HBV i HCV w tej populacji pacjentów. Należy podkreślić iż kolejnym, niezwykle ważnym czynnikiem prowadzącym do znacznego spadku zapadalności na wirusowe zapalenia wątroby jest wprowadzanie w transfuzjologii coraz nowocześniejszych metod diagnostycznych, mających na celu identyfikowanie ww. czynników etiologicznych PZW.

Dzięki zastosowaniu interferonu alfa oraz analogów nukleozydowych (ribawiryny i lamiwudyny) ostatnie lata przyniosły istotną poprawę wyników leczenia przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby typu B oraz C. Jednak nadal marskość wątroby na tle przewlekłych wirusowych zapaleń stanowi u dorosłych jedno z głównych wskazań do przeszczepu tego narządu.

W celu optymalizacji monitorowania przebiegu choroby i przewidywania wyników terapii przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby ważne jest jak najbardziej wnikliwe poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój tych schorzeń. Ze względu na to, że HBV nie wykazuje bezpośredniego działania cytopatogenne, elementem decydującym o przebiegu zakażenia jest interakcja między drobnoustrojem a procesami immunologicznymi zakażonego makroorganizmu. Wydaje się, że odpowiedź typu komórkowego odgrywa w tych procesach zasadniczą rolę. Zniszczenie zakażonych HBV hepatocytów jest skutkiem działania przede wszystkim: cytotoksycznych komórek T, komórek NK (*natural killers*) oraz komórek K (*killers*) [131, 175, 245]. Limfocyty T CD8(+) wraz z antygenami zgodności tkankowej MHC klasy I odpowie-

działne są za prezentację na błonach komórkowych hepatocytów antygenów wirusowych, które powstały w komórkach zakażonych. Eliminacja zakażonych hepatocytów zachodzi bądź na drodze bezpośredniego działania cytotatycznego bądź w wyniku zainicjowania programowanej śmierci komórki – apoptozy. Odbywa się to przy współdziałaniu cytokin [131, 138]. Działanie cytotatyczne limfocytów T CD8+ zależy w dużym stopniu od prawidłowej aktywności limfocytów Th o fenotypie CD4+ oraz produkowanych przez nie cytokin, zarówno o działaniu prozapalnym (TNF- α , IL-1, IL-6), jak i immunomodulującym (m.in.: IL-2, IL-4, IL-5). Naturalny przebieg zakażenia HBV wynika w istotnym stopniu ze stosunku poszczególnych subpopulacji uczulonych limfocytów T CD4+. Dominacja komórek Th1 produkujących IL-2, TNF- α i IFN- γ prowadzi do nasilonej odpowiedzi typu komórkowego, zwykle skutkującej eliminacją HBV. Natomiast przewaga komórek Th2 prowadzi do uwalniania IL-4, IL-5 oraz IL-10 co objawia się najczęściej przetrwałą wiremią, zapaleniem oraz, w związku z aktywacją odporności humoralnej, możliwością stymulacji procesów autoimmunologicznych [18, 35, 100, 153]. Efektem działania komórek NK posiadających zdolność spontanicznego (bez uprzedniej immunizacji) niszczenia komórek docelowych jest eliminacja zakażonych hepatocytów. Komórki K biorą udział w komórkowej cytotoxycznosci zależnej od przeciwciał. Zaburzona funkcja lub liczba komórek NK i K może odgrywać zasadniczą rolę w patogenezie i przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu B [18, 35, 100, 201].

W przypadku sprawnych mechanizmów odpornościowych najczęściej dochodzi do eliminacji wirusa, wyzdrowienia oraz wytworzenia odporności na ponowne zakażenie HBV poprzez wytworzenie przeciwciał anti-HBs. Należy pamiętać, że badania molekularne wskazują jednak na możliwą obecność materiału genetycznego wirusa w surowicy bądź w hepatocytach, mimo obecności w surowicy przeciwciał przeciw antygenowi powierzchniowemu wirusa *hepatitis B*. Istnieje zatem nadal niebezpieczeństwo replikacji i dalszego postępu choroby [48]. Szereg badań, podobnie jak w przypadku NZJ, podkreśla prawdopodobny związek zakażenia HBV z pewnymi antygenami zgodności tkankowej. Częsteczki MHC klasy I oraz II prezentują obce antygeny limfocytom T CD4+ oraz limfocytom T CD8+, aktywując zarówno odpowiedź typu komórkowego, jak i humoralnego [11, 256].

Wydaje się, że podstawową rolę odgrywają tu częsteczki HLA klasy II. Wyniki badań przeprowadzone przez *Thursz i wsp.* oraz *Höhler i wsp.* w Gambii wskazują, że HLA DRB1 1302 zarówno u dzieci, jak i u dorosłych predysponuje raczej do ostrego, samoograniczającego się zakażenia HBV, a nie do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby [86, 254]. *Thio i wsp.* obserwowali natomiast, że współistnienie HLA DQB1*0501-DQB1*0301-DQB1*1102 znamienne częściej towarzyszy przewlekłemu zakażeniu HBV [251]. Wykazano także, że u chorych posiadających częsteczki HLA DR13 rzadko dochodzi do gwałtownej progresji w kierunku przewlekłego zapalenia wątroby, co wynika prawdopodobnie z faktu nasilania przez nie odpowiedzi komórkowej wobec antygeny rdzeniowego HBV w okresie ostrej infekcji [252].

Również polimorfizm w zakresie genów kodujących MBP (*mannose binding protein* – białko wiążące mannozę) może mieć związek z przebiegiem zakażenia HBV. Białko to odgrywa istotną rolę we wrodzonej odporności poprzez aktywację układu dopełniacza oraz fagocytozy. Zidentyfikowano trzy polimorfizmy dla genu

kodującego MBP (w kodonie 52, 54 i 57). Część cząsteczki HBV wśród białek powierzchniowych zawiera bogate w mannozę oligosacharydy mogące wiązać MBP. *Thomas i wsp.* wykazali w badanej populacji przedstawicieli rasy białej z PZW typu B, że 27% z nich było heterozygotą bądź stwierdzono u nich obecność dwóch zmutowanych alleli w kodonie 52 (w grupie kontrolnej tylko u 4%). Być może mutacja w obrębie tego kodonu prowadzi do zaburzeń opsonizacji oraz fagocytozy wobec HBV [253].

Do innych elementów mogących modyfikować przebieg zakażenia HBV zalicza się aktywną postać witaminy D. Ma ona działanie immunomodulujące, polegające na hamowaniu odpowiedzi Th1 i pobudzaniu Th2. *Bellamy i wsp.* wykazali, że pewne polimorfizmy genu kodującego receptor dla witaminy D związane są ze sprawną eliminacją HBV [15].

Przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C zależy przede wszystkim od sprawności układu odpornościowego osoby zakażonej oraz od wzajemnego oddziaływania wirusa i komórek gospodarza. Wirus *hepatitis C* posiada niewielkie bezpośrednie działanie cytopatogenne. W wyniku zakażenia HCV dochodzi do prezentacji antygenów wirusowych limfocytom T o fenotypie CD4+ oraz limfocytom cytotoksycznym CD8+. Limfocyty Th1 CD4+ są źródłem cytokin prozapalnych takich jak: IL-1, IL-2, TNF- α , natomiast populacja Th2 stymuluje produkcję cytokin przeciwzapalnych: IL-4, IL-5, IL-6 oraz IL-10. Subpopulacja limfocytów pomocniczych Th2 odpowiedzialna jest również za aktywację odporności humoralnej poprzez pobudzenie limfocytów B. Niszczenie komórek zakażonych HCV odbywa się poprzez działanie limfocytów cytotoksycznych oraz cytokin prozapalnych. Podobnie jak w przypadku infekcji HBV, przewaga odpowiedzi Th1 prowadzi zwykle do samoograniczenia zakażenia, natomiast dominacja Th2 skutkuje rozwojem przewlekłego zapalenia wątroby. U pacjentów zakażonych HCV zdecydowanie rzadziej obserwuje się ostre zapalenie wątroby niż w przypadku zakażenia HBV, natomiast częściej dochodzi do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby. Może to przemawiać za przewagą odpowiedzi Th2 u tych chorych [177, 259, 280].

Wśród innych przyczyn PZW także w okresie rozwojowym wymienia się autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AIH). Jest to przewlekłe schorzenie zapalne o niejasnej etiologii, obarczone stosunkowo wysokim niebezpieczeństwem rozwoju marskości wątroby i w konsekwencji jej niewydolności. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby jest chorobą rzadko występującą, ale o dużym zróżnicowaniu zapadalności w zależności od rejonu świata. W Północnej Europie i Ameryce częstość AIH wynosi między 50 a 200 przypadków na 1 000 000, natomiast w krajach Azji i Afryki występuje zdecydowanie rzadziej [23, 24, 97, 151]. W Europie Zachodniej AIH stanowi około 20% wszystkich PZW, natomiast w Brazylii nie więcej niż 5 do 10% [24]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby dzieci, u których rozpoznaje się AIH, a w związku z malejącą częstością wirusowych zapaleń wątroby w okresie rozwojowym (przede wszystkim dzięki szczepieniom ochronnym) wydaje się, że schorzenie to może stanowić w przyszłości jedną z głównych postaci PZW w tym przedziale wiekowym [161, 169]. Jak wspomniano, etiologia oraz patomechanizm AIH nie są w pełni wyjaśnione. Pod uwagę bierze się szereg czynników, takich jak: genetyczne, infekcyjne, lecz przede wszystkim złożone nieprawidłowości immunologiczne. Podobnie jak większość schorzeń o podłożu autoimmunologicznym, również AIH występuje głównie u płci żeńskiej (stosunek 8:1). Obserwuje się dwa szczyty zachorowań – pierwszy między 10 a 30 oraz drugi między

50 a 70 rokiem życia. Nie udowodniono bezpośredniego podłoża genetycznego schorzenia, jednak obserwacje wskazują na zdecydowanie częstsze występowanie choroby u rodzeństwa oraz innych członków rodziny. Jako czynniki predysponujące wymienia się również: obecność krążących autoprzeciwciał, hipergammaglobulinemię oraz współistnienie innych schorzeń wątroby [97, 151, 161]. Badania wielośrodkowe wykazały, że u chorych z AIH częściej niż w ogólnej populacji stwierdza się pewne antygeny zgodności tkankowej (np. HLA-B8, HLA-DR3, HLA-DR4) i występowanie ich zależy według niektórych autorów także od rejonu świata [66, 161, 181].

Obserwowano także, że niektóre polimorfizmy dla genu kodującego TNF- α występują częściej u osób z AIH niż w ogólnej populacji [41]. Immunologiczne podłoże AIH nie budzi wątpliwości. Wśród odchyleń w badaniach dodatkowych obserwuje się w surowicy zwykle podwyższony poziom gammaglobulin, immunoglobuliny IgG oraz obecność różnego rodzaju autoprzeciwciał (w 1 typie AIH – przeciwciała niespecyficzne: przeciw mięśniom gładkim SMA, przeciwjądrowe ANA, natomiast w 2 typie AIH – przeciw mikrosomom komórek wątrobowych i nerkowych LKM). Wśród innych autoprzeciwciał znajdujących u chorych z AIH należy wymienić przeciwciała przeciw: rozpuszczalnemu antygenowi wątrobowemu (*Soluble Liver Antigen* SLA), białku wątrobowo-specyficznemu (LSPs), wątrobowemu receptorowi dla asialoglikoproteiny (ASGP-R) oraz przeciwciała antyleukocytarne (pANCA) [97, 151, 161, 269].

Uważa się, że w odróżnieniu od pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, u chorych z AIH nie występują zaburzenia w zakresie składowych dopełniacza C3 i C4. Obserwowane nieraz u tych chorych obniżone ich stężenie jest raczej rezultatem zmniejszonej wątrobowej produkcji, a nie wynikiem czynnego udziału w patogenezie [204].

Należy podkreślić, że niezależnie od przyczyny, utrzymujący się proces zapalny stanowi ogromne niebezpieczeństwo postępującego włóknienia wątroby. Proces włóknienia, będący jednym z następstw choroby, jest wyrazem patologicznego nasilenia zmian, jakie zachodzą w warunkach fizjologicznych w trakcie regeneracji uszkodzonej tkanki. Wydaje się, że głównym mediatorem tego zjawiska może być właśnie TGF- β . O ile cytokina ta może działać jako antagonist lub agonista proliferacji komórek, to zawsze i silnie pobudza komórki do tworzenia składników macierzy pozakomórkowej. Uzasadnia to pogląd, że właśnie TGF- β jest najbardziej zaangażowany w proces włóknienia. Potwierdzają to wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych [19, 62, 234].

W doświadczeniu na szczurach wykazano istnienie znamiennej korelacji między stopniem włóknienia, ilością kolagenu i ekspresją mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wątrobie [101].

U chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby stwierdzono również istnienie zależności między wzmożoną ekspresją mRNA genu *TGF- β 1* a mRNA prokolagenu typu I w wątrobie i zawartością prokolagenu typu III w surowicy krwi [31].

Zarówno u osób zdrowych, jak i w różnych schorzeniach wątroby można wykazać obecność w wątrobie mRNA dla LTBP-1, LTBP-2 i LAP, to jest białek związanych

z nieczynną postacią TGF- β 1. Natomiast sama cytokina była oznaczalna jedynie w ogniskach już zmienionej chorobowo tkanki wątrobowej [116, 168].

Wielu autorów podkreśla, iż ekspresja białka TGF- β 1 w wątrobie w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B i C wykazuje wyraźny związek z terapią interferonem alfa (IFN- α) i rybawiryną. Maleje ona równolegle do remisji histologicznej po leczeniu, a pozostaje podwyższona u chorych nieodpowiadających pozytywnie na leczenie [31, 116]. Jednak *Roulot i wsp.* u pacjentów z PZW typu C nie obserwowali korelacji między stopniem włóknienia a poziomem mRNA genu *TGF- β 1* w tkance wątrobowej [212].

Podobne wnioski, jak w przypadku oceny ekspresji TGF- β 1 w wycinkach wątroby, wypływają z większości badań, w których oceniano przydatność oznaczania poziomu tej cytokiny we krwi. Stwierdzono, że jej poziom w osoczu koreluje znamienne ze stopniem włóknienia wątroby i zawartością TGF- β 1 w wątrobie, a po leczeniu IFN- α obniża się, co może odzwierciedlać redukcję stopnia włóknienia tego narządu [79, 62, 260].

Nie wszyscy autorzy są jednak zgodni w powyższych obserwacjach, co zmniejsza nadzieję, że pomiar poziomu TGF- β 1 w osoczu stanie się powszechną, nieinwazyjną metodą monitorowania włóknienia wątroby, zastępującą nawet ocenę histopatologiczną [135, 212]. Wykazano ponadto, że zawartość TGF- β 1 w osoczu pacjentów z PZW stosunkowo słabo koreluje z niektórymi biochemicznymi markerami jej funkcji [185]. Wydaje się jednak, że po określeniu stopnia wydolności wątroby w oparciu o skalę uwzględniającą różne parametry zarówno biochemiczne, jak i kliniczne, poziom TGF- β 1 w osoczu może służyć jako dodatkowy wskaźnik oceniający stopień uszkodzenia tego narządu (głównie włóknienie) [63].

Publikowane ostatnio doniesienia wskazują na istnienie zaburzonego katabolizmu ECM w wątrobie w stanach jej marskości z towarzyszącą niską aktywnością zapalną. Przemawia za tym wysoki poziom inhibitorów metaloproteinaz i obniżenie aktywności kolagenaz. W tych przypadkach ma miejsce nasilenie ekspresji TGF- β i wiążącej go dekoryny, jednego z proteoglikanów macierzy [53, 272].

Interesujące są również spostrzeżenia *Kobayashi i wsp.* dotyczące chorych z wrodzoną atrezią dróg żółciowych zewnątrzwątrobowych, która u dzieci jest główną przyczyną przewlekłej niewydolności wątroby stanowiącą wskazanie do jej transplantacji. Wykazano, że nasilona tkankowa ekspresja TGF- β 1 w wątrobie, stwierdzona w momencie zabiegu hepatoportoenterostomii oraz wyższe poziomy tej cytokiny w osoczu, badane w trakcie długofalowej obserwacji, predysponują do postępującego włóknienia wątroby, a więc niekorzystnego przebiegu choroby [119, 120]. Również *Lamireau i wsp.* obserwowali wzmożoną ekspresję tej cytokiny w tkance wątrobowej we wrodzonej atrezji zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych w dzieci [128].

1.4. Transformujący czynnik wzrostu TGF- β 1 w patologii wieku rozwojowego

Szczególne znaczenie wydaje się mieć słabo dotychczas zbadany problem wytwarzania i aktywności TGF- β 1 w wieku rozwojowym, przede wszystkim u najmłodszych dzieci, gdzie spotykamy się ze stanem fizjologicznej niedojrzałości

układu immunologicznego. Niedojrzałość ta wyraża się m.in. także niedostateczną produkcją tej cytokiny. W tym tak ważnym okresie życia deficyt endogennego TGF- β 1 wyrównywany jest przez jego podaż z pokarmem matki. Stwierdzono, że TGF- β 1 jest obecny w mleku kobiecym, a jego zawartość w sianie jest większa niż w późniejszym okresie laktacji, a więc odwrotnie proporcjonalnie do stopnia dojrzałości dziecka [155, 219]. Być może ma to znaczenie dla ochrony bariery nabłonkowej śluzówki jelita, w której ekspresja białka TGF- β 1 u najmłodszych dzieci jest niewielka i, jak sugerują badania na zwierzętach, dopiero wraz z wiekiem stopniowo wzrasta [199].

Zmniejszone wytwarzanie TGF- β 1 może oznaczać jego deficyt w zakresie potencjału immunosupresyjnego dziecka, co stwarza warunki sprzyjające występowaniu niektórych schorzeń w wieku rozwojowym, głównie w populacji dzieci najmłodszych. Stwierdzono m.in. obniżoną ekspresję TGF- β 1 w nabłonku jelitowym u dzieci z enteropatią w przebiegu alergii pokarmowej [36] oraz w chorobie trzewnej [141]. W tym przypadku nie można wykluczyć, że przynajmniej częściowo ma to związek z inaktywacją wspomnianej wyżej tkankowej transglutaminazy przez powstające pod wpływem glutenu przeciwciała przeciw endomyzjum mięśni gładkich. Wprawdzie u chorych z celiakią deficytowi TGF- β 1 w nabłonku kosmków jelitowych towarzyszy jego zwiększona ekspresja w blaszce właściwej, może to jednak wynikać z istniejącego tam stanu zapalnego [141]. Również w przypadku *enterocolitis necroticans*, jak się wydaje, brakuje ochronnego, przeciwzapalnego działania TGF- β 1. U dzieci z tym schorzeniem, pod wpływem cytokin prozapalnych, produkcji tlenu azotu i związanej z tym nasiloną apoptozie enterocytów nie towarzyszy wzrost miejscowej ekspresji TGF- β 1, która nie różni się istotnie od wartości w grupie kontrolnej [65].

Cytokina ta uczestniczy także w patogenezie innych stanów chorobowych, przebiegających z włóknieniem. U chorych z astmą stwierdzono podnabłonkową proliferację włókien oraz nacieczenie eozynofilami wykazującymi wzmoczoną ekspresję mRNA genu kodującego TGF- β 1 [171]. Również w doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że alergizacja albuminą jaja kurzego powoduje zmiany zapalne w drogach oddechowych. Towarzyszy temu znamienne zwiększona w komórkach nabłonka oskrzeli, ekspresja białek biorących udział w przekazywaniu impulsu w kierunku jądra komórkowego (Smad3 i Smad4) [209].

Szereg doniesień wskazuje na znaczenie oznaczania TGF- β 1 u dzieci ze schorzeniami układu moczowego [55, 230, 278]. *Yang i wsp.* na podstawie badań doświadczalnych sugerują, że poprzez wpływ na interakcje komórek nabłonkowych i mezenchymalnych TGF- β 1 może odgrywać rolę w generowaniu wrodzonych anomalii rozwojowych nerek [278].

Na pewną zależność między nasileniem schorzenia a zdolnością do produkcji TGF- β 1 wydają się też wskazywać wyniki badań *Proulx i wsp.* Stwierdzili oni, że u dzieci z zakażeniem *E. coli* wytwarzającą verotoksynę, w przypadku łagodnego przebiegu choroby, zawartość TGF- β 1 we krwi była wyższa niż w razie wystąpienia biegunki krwotocznej lub zespołu hemolityczno-mocznicowego [206].

Obserwacje dotyczące dzieci z NZJ i przewlekłymi schorzeniami wątroby są jak dotychczas nieliczne i niejednoznaczne [135, 275]. Badania nad PZW skupiają się przede

wszystkim na zapaleniach o etiologii wirusowej. *Schneiberg i wsp.* oraz *Lebensztejn i wsp.* w grupie dzieci z PZW typu B wykazali wyższe osoczkowe stężenie TGF- β 1 w porównaniu z grupą kontrolną i wynikami uzyskanymi po leczeniu lamiwudyną [135, 225]. Natomiast badania *Kadera i wsp.* przeprowadzone u młodzieży z NZJ, wykazały znamienne wyższe poziomy TGF- β 1 w osoczu u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna w okresie remisji klinicznej w porównaniu z aktywną fazą choroby [104].

1.5. Ocena transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1 w moczu w niektórych stanach chorobowych

W ostatnich latach podkreśla się także możliwość wykorzystania oceny stężenia TGF- β 1 w moczu w celu diagnozowania i prognozowania przebiegu niektórych stanów klinicznych [55, 74, 85, 230, 257, 258, 267].

Szereg doniesień porusza to zagadnienie w aspekcie schorzeń układu moczowego [55, 74, 85, 230, 267]. Poziom tej cytokiny oznaczano w moczu w grupie dzieci (od 1 do 24 m.ż) z pierwszorazową infekcją układu moczowego bez towarzyszących wad anatomicznych w jego obrębie. Zdecydowanie częściej wyższe poziomy tej cytokiny wykazano u dzieci, u których ocenę wykonano krótko (do 12 godz.) po włączeniu leczenia przeciwbakteryjnego i u których w badaniu scyntygraficznym nerek (DMSA), przeprowadzonym między 3 a 14 dniem od rozpoznania, nie wykazano zmian.

Spostrzeżenia powyższe sugerują ewentualny wpływ tej cytokiny na proces fibrogezy oraz na zejście śródmiąższowego bakteryjnego zapalenia nerek u dzieci [55]. Jest to szczególnie istotne w tej grupie wiekowej, gdyż właśnie przebycie infekcji układu moczowego do 12 miesiąca życia predysponuje do następowego powstawania zmian bliznowatych w nerkach [229]. *Wasilewska i wsp.* wykazali znamienne obniżenie poziomu TGF- β 1 w moczu u dzieci ze sterydoopornym zespołem nerczycowym w trakcie terapii cyklosporyną A. Spadek poziomu TGF- β 1 w moczu korelował pozytywnie z obniżaniem się białkomoczu u tych chorych [267]. Natomiast *Smółko i wsp.* oceniali zachowanie się tej cytokiny w moczu u dzieci ze wstecznym odpływem pęcherzowo-moczowodowym. Stwierdzili, że wydalanie TGF- β 1 z moczem wzrasta wraz ze stopniem wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego [230]. Badacze fińscy wykazali natomiast zwiększone wydalanie TGF- β 1 z moczem u chorych po transplantacji nerki, u których stwierdzono współistnienie zakażenia wirusem cytomegalii, korelowało to także z nasileniem włóknienia w przeszczepionym narządzie [85].

Wydaje się, że także u pacjentów z przewlekłymi schorzeniami wątroby w monitorowaniu ich przebiegu może znaleźć zastosowanie badanie poziomu TGF- β 1 w moczu. Doniesienia *Tsai i wsp.* wskazują na taką zależność u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Wyższe poziomy TGF- β 1 w moczu wyraźnie korelowały z nasileniem włóknienia w wątrobie [257].

1.6. Polimorfizmy genu kodującego transformujący czynnik wzrostu TGF- β 1

Najnowsze dane z piśmiennictwa zwracają uwagę na możliwą zależność między polimorfizmem genu kodującego TGF- β 1 a zapadalnością na niektóre przewlekłe schorzenia bądź modyfikowaniem ich przebiegu [5, 17, 29, 39, 69, 80, 152, 195, 211, 262, 279]. Zmianami polimorficznymi na poziomie genu określa się jednocześnie występowanie w populacji różnych form allelicznych danego genotypu. Może to skutkować zmianami w budowie lub ilości białka kodowanego przez dany gen. W terminologii biologicznej mutacją nazywamy każdą utrwaloną zmianę sekwencji nukleotydów w genomie, niezależnie od jej skutków czy częstości występowania. Natomiast w nomenklaturze medycznej o mutacji mówimy wówczas, gdy częstość występowania danej zmiany polimorficznej w populacji jest większa niż 1% [8]. Dotychczas opisano osiem polimorfizmów dla genu *TGF- β 1* [28, 46, 76, 130, 246].

Dwie najczęściej opisywane zmiany dotyczą eksonu 1: w pozycji +869 (T869C) substytucja tyminy na cytozynę występująca w kodonie 10 (powodująca zamianę reszt aminokwasów leucyny na prolinę) oraz w pozycji +915 (G915C) substytucja guaniny na cytozynę w kodonie 25 (powodująca zamianę reszt aminokwasów argininy na prolinę) [13, 29, 37, 39, 52, 69, 114, 137, 194, 242, 282].

Według większości doniesień najwyższa produkcja TGF- β 1 obserwowana jest w przypadku homozygoty TT w kodonie 10 (869T/T) i homozygoty GG w kodonie 25 (915G/G) [89].

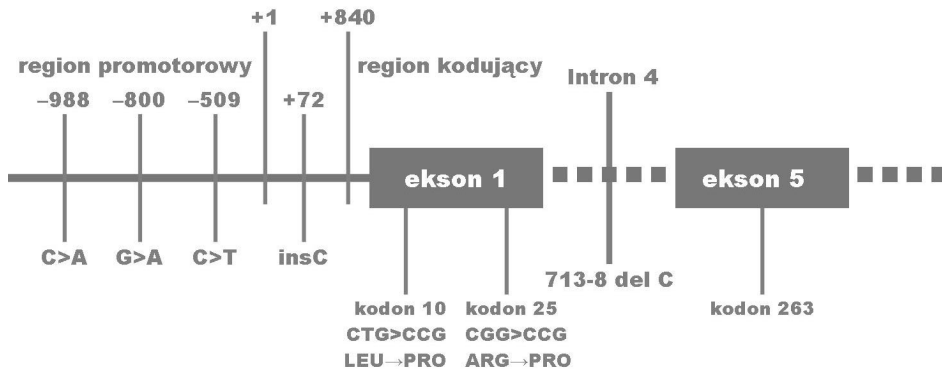
Z innych często opisywanych polimorfizmów wymienia się dwie zmiany w rejonie promotorowym: w pozycji -800 (G-800A) substytucja guaniny na adeninę oraz w pozycji -509 (C-509T) cytozyny na tyminę.

Pozostałe znacznie rzadziej opisywane polimorfizmy dotyczą:

- pozycji -988 substytucja cytozyny na adeninę w rejonie promotorowym,
- pozycji +72 insercja C, w rejonie nietranslacyjnym,
- pozycji +788 substytucja cytozyny na tyminę, w eksonie 5, kodon 263,
- pozycji +713, delekcja C, w intronie 4

[13, 39, 76, 84, 114, 115, 129, 130, 137, 139, 279].

Poniżej przedstawiono schematycznie lokalizację znanych polimorfizmów w genie *TGF- β 1*.



Ryc. 1. Schemat lokalizacji znanych polimorfizmów genu kodującego TGF-β1 [69]

Fig. 1. Location of known polymorphisms in the TGF-β1 gene [69]

1.6.1. Rola polimorfizmu genu kodującego transformujący czynnik wzrostu TGF-β1 w przebiegu niektórych stanów chorobowych

Jak wspomniano najczęstsze opisywane zmiany dotyczą polimorfizmu genu *TGF-β1* i polegają na substytucji pojedynczych zasad w eksonie 1: w kodonie 10 oraz 25. Zależność między obecnością powyższych polimorfizmów a przebiegiem klinicznym niektórych chorób opisano m.in.: w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C [69, 262], retinopatii cukrzycowej [17], mukowiscydozie [5, 52], czy zespole mielodysplastycznym [80].

Wyniki badań przeprowadzonych w populacji chińskiej u pacjentów z astmą oskrzelową wskazują, że ich obecność ma wpływ na przebieg kliniczny choroby, szczególnie na patogenezę obturacji dróg oddechowych [152]. Także badania *Solari i wsp.* zwracają uwagę na wyższe ryzyko rozwoju nefropatii w przebiegu odpływu pęcherzowo-moczowodowego u dzieci i młodych dorosłych, u których wykazano obecność powyższych polimorfizmów dla genu *TGF-β* [231].

Natomiast *Cantor i wsp.* w grupie prawie dwustu pacjentów z NZJ wykazali, że występowanie polimorfizmów dla genu *TGF-β1* w eksonie 1 nie predysponuje wprawdzie do zachorowania, lecz ma wpływ na przebieg kliniczny schorzenia, głównie choroby Leśniowskiego-Crohna. Są to jednak doniesienia wstępne wymagające dalszych badań [29].

Jak wspomniano inne, stosunkowo często badane polimorfizmy dla genu kodującego TGF-β1, to zmiany w rejonie promotorowym. *Yang i wsp.* u 29 dzieci z chorobą Schönleina-Henocha wykazali zależność między przebiegiem klinicznym schorzenia a obecnością polimorfizmu C-509T. Stwierdzono, że genotyp -509T/T (homozygota z mutacją) korelował z cięższą postacią choroby, szczególnie w przypadku objęcia procesem chorobowym także nerek [279]. Podobne spostrzeżenia dotyczące pacjentów z astmą oskrzelową poczynił *Mak i wsp.* [152]. Dane z piśmiennictwa sugerują również możliwość istnienia związku między innymi genotypami *TGF-β1* a zwiększoną skłonnością do

występowania pewnych schorzeń bądź odmiennego ich przebiegu klinicznego, np.: osteoporozy [195], nasilonego włóknienia po radioterapii [207], cukrzycy typu 2 [211] oraz raka sutka [146].

Badania nad polimorfizmem genu kodującego TGF- β u dzieci z atopowym zapaleniem skóry wykazały w 95% przypadków obecność alleli związanych z obniżoną produkcją tej cytokiny. Wydaje się więc, że powyższe genotypy mogą stanowić czynnik ryzyka zachorowania na tę jednostkę chorobową [4].

Z istnieniem określonego genotypu może też być związana tendencja do powstawania bliznowatych zmian w nerkach w przebiegu zakażeń układu moczowego [39].

Podkreślenia wymaga również fakt, że wpływ na przebieg choroby bądź zwiększone ryzyko jej wystąpienia mogą mieć nie tylko zmiany w genie kodującym sam TGF- β 1, ale również dotyczące innych elementów, od których zależy pełna jego aktywność biologiczna (receptorów, białek magazynujących, transportowych czy pośredniczących w przekazywaniu sygnału – m.in. białka z rodziny Smad) [82, 83, 173]. Według niektórych autorów właśnie aktywowanie bądź hamowanie TGF- β [26], czy poszczególnych ogniw biorących udział w jego aktywacji, może być w przyszłości wykorzystane w terapii niektórych schorzeń [99,173].

Wobec nadal ostatecznie niewyjaśnionej etiopatogenezy, różnorodności obrazu klinicznego, trudności terapeutycznych przewlekłych procesów zapalnych oraz poważnych, często trwałych następstw, nieustannie trwają badania mające na celu nie tylko poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych, ale także bliższe poznanie czynników odpowiedzialnych za ujawnienie się i przebieg tych schorzeń. Lepsze poznanie natury tych chorób pozwoli być może na wdrożenie celowanego, a więc prawdopodobnie skuteczniejszego leczenia.

W związku z tym, iż coraz więcej danych wskazuje na to, że istotą etiopatogenezy przewlekłych procesów zapalnych jest zmieniona aktywność biologiczna cytokin, w tym także transformującego czynnika wzrostu beta1 (TGF- β 1), cenne wydaje się jak najbardziej szczegółowe poznanie jego roli w tych schorzeniach. Nadal nie wiadomo, czy w przebiegu stanów zapalnych zwiększona ekspresja TGF- β 1 jest czynnikiem pierwotnym, wyzwalającym określone mechanizmy patofizjologiczne, czy jest to efekt wtórny w stosunku do toczącego się procesu chorobowego.

Doniesienia poruszające tę problematykę u dzieci są nieliczne i dotyczą zwykle niewielkich grup badanych.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień dotyczących zarówno dzieci, jak i dorosłych z przewlekłymi stanami zapalnymi, obejmujących kompleksową ocenę TGF- β 1: jego poziomu we krwi, ekspresji w zmienionych chorobowo tkankach oraz ewentualnej zależności występowania oraz przebiegu tych schorzeń od polimorfizmu genu kodującego tę tak wszechstronnie działającą cytokinę.

2. Cel pracy

Głównym celem podjętych badań była próba oceny, w jakim stopniu w patogenezie przewlekłych stanów zapalnych u dzieci, szczególnie niewoistych zapaleń jelit (NZJ) i przewlekłych zapaleń wątroby (PZW), uczestniczy transformujący czynnik wzrostu beta1 (TGF- β 1), a także próba ustalenia, czy oznaczanie zawartości tej cytokiny we krwi lub w tkance może być pomocne w rozpoznawaniu, ocenie aktywności i stopnia zaawansowania oraz w monitorowaniu przebiegu tych schorzeń.

W tym celu na podstawie badań wykonywanych w okresie aktywnym choroby i u części pacjentów ponownie, w czasie remisji, oceniano:

1. Stężenie TGF- β 1 w osoczu.
2. Zawartość TGF- β 1 w tkance (w błonie śluzowej jelita – u dzieci z NZJ oraz w wątrobie – u dzieci z PZW) metodą immunohistochemiczną.
3. Obecność i poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR) w błonie śluzowej jelita – u dzieci z NZJ oraz w wątrobie – u dzieci z PZW.
4. Korelację między stężeniem TGF- β 1 w osoczu, nasileniem reakcji immunohistochemicznej na obecność TGF- β 1 oraz poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym w badanych tkankach a:
 - przebiegiem klinicznym choroby,
 - nasileniem zmian histopatologicznych w badanych tkankach,
 - wynikiem badania endoskopowego u pacjentów z NZJ,
 - wynikami wybranych badań dodatkowych.

Ponadto w celu oceny ewentualnego udziału czynników genetycznych w modyfikowaniu zawartości TGF- β 1 w osoczu i/lub w tkance oraz przebiegu NZJ i PZW, badano korelację między czterema analizowanymi polimorfizmami dla genu kodującego TGF- β 1 a:

- występowaniem i przebiegiem klinicznym analizowanych przewlekłych schorzeń zapalnych układu pokarmowego,
- stężeniem TGF- β 1 w osoczu,
- nasileniem reakcji immunohistochemicznej na obecność TGF- β 1 w badanych tkankach,
- poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR) w badanych tkankach,
- wybranymi parametrami laboratoryjnymi.

Dodatkowym celem pracy było ustalenie na podstawie wyników badania grupy kontrolnej wartości referencyjnych stężenia TGF- β 1 w osoczu u dzieci.

3. Pacjenci i metody

3.1. Charakterystyka badanych

Badaniami objęto 167 dzieci, w tym 97 chłopców (58,1%) oraz 70 dziewcząt (41,9%). Wiek pacjentów wahał się od 1,5 do 18,4 lat (średnio $12,5 \pm 4,5$ lat, mediana 14,0 lat). Pacjenci byli leczeni w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 2002-2006.

W analizowanej grupie było:

- A. 104 pacjentów (w wieku od 1,5 do 18,4 lat, średni wiek $13,0 \pm 4,5$ lat, mediana 14,5 lat) z rozpoznaniem nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) (37 dziewcząt i 67 chłopców),
- 36 dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) (10 dziewcząt i 26 chłopców, w wieku od 1,5 do 18,0 lat, średni wiek $12,9 \pm 4,8$ lat, mediana 15,0 lat),
 - 68 dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC) (27 dziewcząt i 41 chłopców, w wieku od 4,0 do 18,4 lat, średni wiek $13,1 \pm 4,4$ lat, mediana 14,0 lat).
- B. 21 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (PZW) (13 dziewcząt i 8 chłopców, w wieku od 6,0 do 18,0 lat, średni wiek $13,0 \pm 3,0$ lat, mediana – 13,0 lat),
- 10 dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (HBV) (6 dziewcząt i 4 chłopców, w wieku od 11,0 do 18,0 lat, średni wiek $13,6 \pm 2,1$ lat, mediana 13,0 lat),
 - 4 dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV) (4 dziewczęta, w wieku od 8,0 do 16,0 lat, średni wiek $12,3 \pm 3,9$ lat, mediana 12,5 lat),
 - 7 dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) (3 dziewczęta i 4 chłopców, w wieku od 6,0 do 17,0 lat, średni wiek $12,7 \pm 4,0$ lat, mediana 15,0 lat).
- C. Grupę kontrolną (porównawczą) (K) stanowiło 42 dzieci: 20 dziewcząt i 22 chłopców, w wieku od 2,0 do 18,0 lat (średni wiek $11,0 \pm 5,0$ lat, mediana 11,0 lat), u których w związku z obserwowanymi objawami (epizody krwawienia z przewodu pokarmowego) przeprowadzono badanie endoskopowe dolnego odcinka przewodu pokarmowego i wykonywano badania diagnostyczne pozwalające wykluczyć: stan zapalny, zaburzenia immunologiczne, zaburzenia odżywienia oraz choroby nowotworowe. Badani w okresie 6 miesięcy poprzedzających oznaczenia nie przyjmowali preparatów immunomodujących.

Szczegółową charakterystykę badanych grup przedstawiają tabele 1 i 2.

Tab. 1. Liczba badanych w zależności od rozpoznania

Tabl. 1. Number of children according to diagnosis

Grupa <i>Group</i>	Liczba dzieci <i>Number of children</i>	Odsetek (%) <i>Percent (%)</i>
UC	68	40,72
CD	36	21,56
AIH	7	4,19
HBV	10	5,99
HCV	4	2,39
K	42	25,15
Razem / <i>Total</i>	167	100%

Tab. 2. Wiek dzieci w poszczególnych grupach badanych (lata)

Tabl. 2. Age of children in the study groups (years)

Grupa <i>Group</i>	N	Średni wiek <i>Mean age</i>	Mediana <i>Median</i>	Min.	Max	SD
K / <i>Control</i>	42	11,0	11,0	2,0	18,0	5,0
PZW / <i>Ch.h.</i>	21	13,1	13,0	6,0	17,0	3,0
NZJ / <i>IBD</i>	104	13,0	14,5	1,5	18,4	4,5

Kryteria kwalifikacji chorych do poszczególnych grup i podgrup badanych

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) rozpoznawano na podstawie:

- obrazu klinicznego – badanie podmiotowe i przedmiotowe: wywiad rodzinny, wzdęcia i bóle brzucha, liczba wypróżnień i charakter stolców, obecność w stolcu domieszek patologicznych (krew, śluz), utrata masy ciała, osłabienie, błądź, tkliwość brzucha w badaniu palpacyjnym, ewentualnie inne niecharakterystyczne objawy kliniczne,
- badania endoskopowego – kolonoskopia (kolonoskopia pełna),
- badania histopatologicznego bioptatów błony śluzowej jelita,
- odchyień w badaniach dodatkowych: morfologia krwi, liczba płytek krwi, parametry stanu zapalnego (CRP, OB), poziom żelaza oraz białka całkowitego i albuminy w surowicy, elektroforeza białek surowicy.

Kwalifikację oceny zarówno endoskopowej, jak i histologicznej błony śluzowej jelita u chorych z NZJ (dla pacjentów z CD i UC) przeprowadzono w oparciu o kryteria Porto (Portugal, March 14-15 2003) [91].

U wszystkich pacjentów z rozpoznaniem przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit została dokonana ocena aktywności rzutu choroby w oparciu o powszechnie stosowane i akceptowane skale. W ocenie stopnia ciężkości przebiegu choroby Leśniowskie-

go-Crohna (CD) zastosowano skalę wg Hyamsa w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego (PCDAI – *Pediatric Crohn's Disease Activity Index*), a w przypadkach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC) – skalę Truelove'a-Witts'a [215, 216].

W dalszej analizie nie korzystano z bezwzględnej wartości punktowej uzyskanej przez poszczególnych pacjentów, lecz kwalifikowano ich do poniższych grup w zależności o sumy uzyskanych punktów:

PCDAI dla CD (PCDAI for CD):

<10 pkt	– brak aktywności (<i>no clinical activity</i>)
11-30 pkt	– postać łagodna (<i>mild activity</i>)
31-50 pkt	– postać umiarkowana (<i>moderated activity</i>)
> 51 pkt	– postać ciężka (<i>high activity</i>)

Skala Truelove'a-Wittsa dla UC w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego:

(Scale Truelove-Witts for UC modified by Ryzko and Woynarowski):

<4 pkt	– postać łagodna (<i>mild activity</i>)
5-8 pkt	– postać umiarkowana (<i>moderated activity</i>)
> 9 pkt	– postać ciężka (<i>high activity</i>)

Rozpoznanie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby (PZW) typu B bądź C ustalano na podstawie:

- utrzymującej się minimum 6 miesięcy podwyższonej aktywności aminotransferazy alaninowej – ALT,
- obecności antygenów: HBs i HBe we krwi u dzieci zakażonych HBV oraz wykazania obecności HCV-RNA w surowicy w zakażeniu HCV.

U wszystkich badanych dzieci z przewlekłymi wirusowymi zapaleniami wątroby wykonywano ślepią biopsję wątroby w celu określenia w tkance wątrobowej nasilenia zmian zapalnych (*grading*) oraz włóknienia (*staging*) ocenianych w skali od 0 do 4 [68, 93].

Autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AIH) rozpoznawano na podstawie:

- biochemicznych cech uszkodzenia wątroby i/lub cholestazy (aktywność w surowicy: aminotransferazy alaninowej – ALT i asparaginianowej – AST, gammaglutamylotranspeptydazy – GGTP, stężenie bilirubiny całkowitej i jej frakcji),
- podwyższonego poziomu gammaglobulin oraz immunoglobuliny klasy G (IgG) w surowicy krwi,
- obecności w surowicy chorych autoprzeciwciał (ANA, SMA, LKM) w mianie większym lub równym 1:40,
- charakterystycznego obrazu w badaniu histopatologicznym wycinka wątroby,
- wykluczenia innych przyczyn zapalenia wątroby (m.in.: infekcyjnych, metabolicznych, toksycznych) [151].

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Badanie lekarskie

U wszystkich objętych analizą dzieci przeprowadzono szczegółowe badanie podmiotowe i przedmiotowe. Zwracano uwagę przede wszystkim na występowanie schorzeń przewlekłych, analizowano zapadalność na ostre choroby infekcyjne. Przeprowadzono szczegółowy wywiad dotyczący choroby podstawowej (wywiad rodzinny, epidemiologiczny, nawyki żywieniowe, wiek zachorowania, okres trwania dolegliwości, przebieg kliniczny, przebyte zabiegi chirurgiczne, stosowane leczenie, jego tolerancja oraz efekty wdrożonego leczenia, szczepienia ochronne).

U badanych dzieci oceniano: parametry antropometryczne – masa ciała, wzrost oraz badano stan odżywienia na podstawie wybranych wskaźników – wskaźnika Cole'a oraz BMI (*Body Mass Index*).

Wskaźnik Cole'a, który jest szeroko stosowany u pacjentów z NZJ, wyrażony w procentach, pozwala na następującą klasyfikację stanu odżywienia chorych:

> 110%	– otyłość (stopień 5)
90-100%	– norma (stopień 4)
85-90%	– nieznaczne niedożywienie (stopień 3)
75-85%	– niedożywienie (stopień 2)
< 75%	– wyniszczenie (stopień 1)

3.2.2. Pobieranie materiału i zakres wykonywanych badań

3.2.2.1. Badania laboratoryjne

U pacjentów z przewlekłymi stanami zapalnymi, w ostrym (aktywnym) okresie choroby wykonywano oznaczenia we krwi oraz, w przypadkach wyraźnych wskazań medycznych do przeprowadzenia badania endoskopowego bądź biopsji wątroby, również w błonie śluzowej jelita i wycinku wątroby.

Natomiast w okresach remisji badania ograniczono najczęściej do oznaczania stężenia TGF- β 1 w osoczu metodą ELISA oraz, w niektórych ściśle określonych przypadkach (konieczna endoskopowa kontrola wyników leczenia w NZJ), wykonywano oznaczenia również w wycinkach błony śluzowej jelit.

Krew, w celu analizy polimorfizmu dla genu kodującego TGF- β 1, pobierano w dowolnym momencie obserwacji.

Materiał biologiczny do przeprowadzenia wszystkich powyższych oznaczeń pobierano w trakcie wykonywania innych, niezbędnych badań diagnostycznych.

W badanych grupach chorych we krwi analizowano:

Parametry konieczne dla ustalenia rozpoznania:

- dla przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby – antygeny HBs i HBe, przeciwciała anti-HBe i anti-HCV oraz HCV-RNA w surowicy krwi,

- dla przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia wątroby – elektroforeza białek, poziom immunoglobuliny G, miano autoprzeciwciał: ANA (przeciwwądrowych), SMA (przeciw mięśniom gładkim), LKM (przeciw mikrosomom komórek nerkowych i wątrobowych) oraz szeroką diagnostykę różnicową w kierunku wykluczenia przyczyn infekcyjnych i metabolicznych uszkodzenia wątroby,
- dla przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit – szeroką diagnostykę różnicową w kierunku przyczyn infekcyjnych, zaburzeń trawienia i wchłaniania oraz nieprawidłowości czynnościowych.

Badania określające nasilenie stanu zapalnego:

- stężenie białka C-reaktywnego,
- wartość OB,
- liczba krwinek białych w morfologii krwi obwodowej,
- wzór odsetkowy krwinek białych w morfologii krwi obwodowej,
- liczba płytek krwi w morfologii krwi obwodowej,
- elektroforeza białek,
- poziom żelaza w surowicy krwi.

Wszystkie wyżej wymienione badania dodatkowe wykonywano w ramach niezbędnej, rutynowej diagnostyki i nie był w tym celu dodatkowo pobierany materiał biologiczny.

3.2.2.2. Oznaczanie TGF- β 1 w osoczu

Stężenie TGF- β 1 w osoczu oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu opartego na technice ELISA (Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Krew w warunkach jałowych, przy okazji wykonywania innych, koniecznych badań, pobierano do probówki z EDTA (*K3EDTA Aticoagulant Vacutest Kima*), bezpośrednio po tym materiał umieszczano w termosie z lodem. W ciągu 30 min od momentu pobrania materiał był wirowany z prędkością 4000 x g przez 10 min w temperaturze 2–8°C. W celu eliminacji płytek krwi osocze poddawano ponownemu wirowaniu 3 razy po 10 min, 12000 x g w temperaturze 2–8°C. Próbki były następnie zamrażane w temperaturze -70°C i przechowywane do momentu wykonywania oznaczeń.

Stężenie TGF- β 1 w osoczu oznaczano przy pomocy kanapkowego testu immunoenzymatycznego (*sandwich ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay*) ściśle według instrukcji podanej przez producenta.

Przed oznaczeniem próbki poddawano procedurze aktywacji w celu zmiany latentnej formy TGF- β 1 w formę immunoreaktywną. W tym celu do 0,1 ml próbki dodawano 0,1 ml 2,5 M kwasu octowego w 10 M roztworze mocznika, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, neutralizowano przez dodanie 0,1 ml 2,7 M NaOH w 1 M HEPES, a następnie rozcieńczano w stosunku 1:4.

Standardy i próbki poddane procedurze aktywacji podawano w duplikatach w objętości 200 μ l do studzienek 96-polowej płytki, pokrytych rozpuszczalnym recepto-

rem dla TGF- β 1 typu II i poddawano inkubacji w temperaturze pokojowej przez 3 godziny.

Następnie studzienki płukano 4-krotnie buforem płuczącym i dodawano 200 μ l roztworu poliklonalnych przeciwciał przeciwko TGF- β 1 związanych z peroksydazą chrzanową i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1,5 godziny. Płytkę płukano 4-krotnie, dodawano 200 μ l roztworu substratu (tetrametylobenzodyna i nadtlenek wodoru) i inkubowano w ciemności przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję barwną przerywano dodając 50 μ l 2 N kwasu siarkowego.

Odczytu płytki dokonywano przed upływem 30 minut, przy długości fali 450 nm, korekcję przeprowadzano przy długości fali 540 lub 570 nm. Pomiaru TGF- β 1 dokonywano w oparciu o krzywą standardową powstałą z odczytu 7 próbek o znanym stężeniu białka (od 1000 pg/ml do 0 pg/ml).

W używanym zestawie próg czułości dla TGF- β 1 wynosił ok. 7 pg/ml, precyzja pomiaru w oznaczeniu (*intra-assay precision*) wynosiła 4,9% a precyzja pomiaru pomiędzy oznaczeniami (*inter-assay precision*) 10,3%.

Próbki krwi w celu oznaczenia stężenia TGF- β 1 pobierano u dzieci z NZJ w dniu wykonywania badania kolonoskopowego, a w przypadku PZW w dniu wykonywania biopsji wątroby.

Badanie przeprowadzono w Zakładzie Immunopatologii AMG (kierownik: prof. dr hab med. Jan Stępiński)

3.2.2.3. Pobieranie wycinków błony śluzowej jelita oraz wątroby

Przy pomocy endoskopu (kolonoskop GIF PQ 20 firmy Olympus - Japonia) w trakcie kolonoskopii wykonywanej w znieczuleniu ogólnym pobierano fragmenty błony śluzowej jelita (w przypadku NZJ z miejsc makroskopowo zmienionych chorobowo oraz u części pacjentów z miejsc bez makroskopowych zmian patologicznych). Słepą biopsję wątroby wykonywano także w krótkotrwałym znieczuleniu ogólnym, materiał tkankowy pobierano przy pomocy igły Hepafix firmy Braun 1,2-1,4.

Z części bioptatów, zarówno błony śluzowej jelita, jak i wątroby, po utrwaleniu w formalinie wykonano preparaty histologiczne (badania rutynowo przeprowadzane w tych grupach chorych). Pozostałe skrawki natychmiast zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -70°C do czasu wykonywania dalszych oznaczeń.

3.2.2.4. Ocena zmian histopatologicznych w błonie śluzowej jelita i w tkance wątrobowej

Aktywność zmian zapalnych w jelicie w przypadku NZJ była oceniana w Zakładzie Patomorfologii Pomorskiego Centrum Traumatologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku (kierownik: lek. med. Maria Łaba) wg kryteriów opublikowanych przez *Tanakę i wsp.* [249].

Preparaty histopatologiczne wycinków wątroby oceniane były przez prof. dr hab. med. Juliana Stolarczyka oraz w Zakładzie Patomorfologii Pomorskiego Centrum Traumatologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku. W badanych bioptatach wątroby, zgodnie z zaleceniami Światowego Kongresu Gastroenterologów

w 1995 roku, oddzielnie, w skali punktowej od 0 do 4, oceniano aktywność zmian zapalnych (*grading*) i zaawansowanie włóknienia (*staging*) [93]. Skala ta jest również polecana przez patologów polskich [68].

3.2.2.5. Ocena obecności TGF- β 1 w skrawkach błony śluzowej jelita oraz w biopsjach wątroby metodą immunohistochemiczną (IHC)

Materiał tkankowy uzyskany drogą biopsji błony śluzowej jelit i wątroby przechowywany w temperaturze -70°C , skrawano przy użyciu kriostatu Leica CM 1900 w temperaturze -30°C , a następnie umieszczano w zamrażarce, w temperaturze -70°C do czasu wykonywania oznaczeń. Skrawki mrożeniowe o grubości $10\ \mu\text{m}$ po wyjęciu z zamrażarki pozostawiano na 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie tkankę traktowano zimnym acetonem. Po upływie 20 minut szkiełka ze skrawkami tkanek umieszczano w PBS (*Phosphate Buffered Saline* – fizjologiczny roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami) na 10 minut. W celu zablokowania endogennej peroksydazy dodawano na skrawki 0,3% H_2O_2 w metanolu (30 minut). Kolejnym etapem było płukanie skrawków w PBS przez 10 minut.

Barwienie immunocytochemiczne przeprowadzano w następujący sposób: na przygotowane skrawki tkankowe nakładano 2% roztwór surowicy (surowica kozia – *goat normal serum*, Vectastain ABC Kit, PK-4001, Vector Laboratories, USA) w PBS z 0,3% Tritonem X-100 i poddawano 2-godzinnej inkubacji. Następnie dodawano królicze przeciwciała pierwotne anty-TGF- β 1 (*rabbit polyclonal IgG anti-TGF- β 1*, sc-146, Santa Cruz Biotechnology, USA). Przeciwciała stosowano w rozcieńczeniu 1:50 w PBS z 0,3% Tritonem X-100 i 2% surowicą kozią (Vector Laboratories, USA). W ten sposób przygotowane preparaty inkubowano w temperaturze 4°C przez 14 godzin, po czym płukano przez 10 min w PBS.

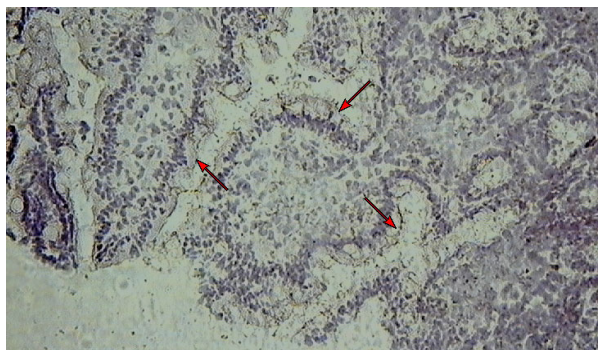
Następnie nakładano roztwór (1:200) kozich przeciwciał drugorzędowych biotynylowanych anty-króliczych (*anti-rabbit IgG, biotinylated antibody*, Vectastain ABC Kit, PK-4001, Vector Laboratories, USA) w 2% surowicy koziej (Vector Laboratories, USA) w PBS, inkubowano przez 1,5 godziny i płukano w PBS przez 10 min.

Powstały kompleks uwidaczniano po 1-godzinnej inkubacji z ABC (kompleks awidyny i biotynylowanej peroksydazy, Vectastain ABC Kit, PK-4001, Vector Laboratories, USA) i zabarwieniu komórek immunoreaktywnych przy użyciu DAB (3,3-diaminobenzydyna, ICN Biomedicals Inc. USA). Barwa reakcji enzymatycznej – brązowa.

Następnie jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną i zamykano skrawki za pomocą odczynnika do nakrywania preparatów mikroskopowych (*mounting medium DPX*; Polskie Odczynniki Chemiczne – POCH).

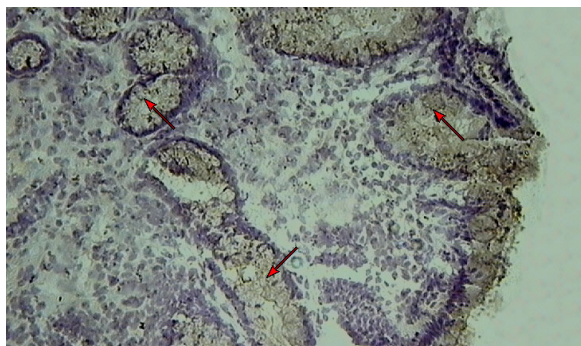
Do oceny doświadczenia wykorzystano mikroskop Eclipse 800 (Nikon, Japonia). Preparaty oceniano w powiększeniu (x200 i x400). Wyniki przedstawiono w sposób półilościowy: minimalne nasilenie reakcji IHC (+), maksymalne nasilenie reakcji IHC (+++) [30, 54]. Dla celów analizy statystycznej powyższe wyniki przedstawiono w następujący sposób: (+) – 1+, (++) – 2+, (+++) – 3+.

Poniżej pokazano przykładowe wyniki reakcji IHC w wycinkach błony śluzowej jelit w badanej grupie pacjentów.



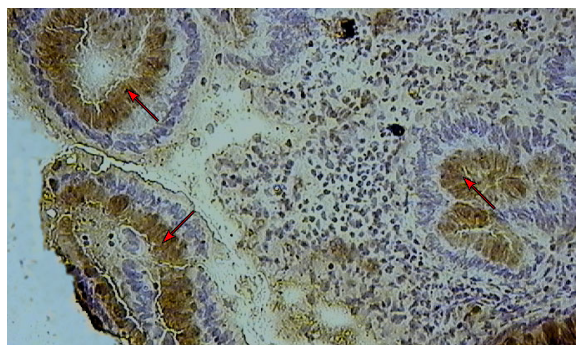
Ryc. 2. Kontrola negatywna – brak reakcji pozytywnej. Błona śluzowa jelita cienkiego. Strzałki wskazują enterocyty, w których nie stwierdzono obecności TGF- β 1. Powiększenie 200x

Fig. 2. Negative control – no reaction in the intestinal mucosa. Arrows point to enterocytes with no staining for TGF- β 1. Magnification 200x



Ryc. 3. Błona śluzowa jelita grubego chorego z UC. Strzałki wskazują pozytywną reakcję na obecność TGF- β 1 w enterocytach, intensywność reakcji IHC 2+. Powiększenie 200x

Fig. 3. Colon mucosa in patient with UC. Arrows point to enterocytes with positive staining for TGF- β 1 with IHC intensity of 2+. Magnification 200x



Ryc. 4. Błona śluzowa jelita grubego chorego z UC. Strzałki wskazują pozytywną reakcję na obecność TGF- β 1 w enterocytach, intensywność reakcji IHC 3+. Powiększenie 200x

Fig. 4. Colon mucosa in patient with UC. Arrows point to enterocytes with positive staining for TGF- β 1 with IHC intensity of 3+. Magnification 200x

Badania przeprowadzono w Katedrze Histologii i Immunologii AMG (kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Mysliwski).

3.2.2.6. Wykrywanie obecności i oznaczanie poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w bioptatach błony śluzowej jelita i wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time PCR*)

1. Izolacja RNA

Izolację RNA z fragmentów tkanek uprzednio pobranych od pacjentów i zamrożonych w temperaturze -70°C , przeprowadzano przy użyciu zestawu „*Total RNA Prep Plus*” firmy A&A Biotechnology (Polska) według instrukcji producenta. Stężenie i czystość wyizolowanego RNA określano metodą spektrofotometryczną, wykorzystując urządzenie Smart SpecTM3000 (Bio-Rad, USA).

2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto: 0,8 μg RNA (wyizolowanego jak opisano w pkt 1), 200 jednostek odwrotnej transkryptazy M-MLV, 0,4 μg startera oligo (dT), 25 jednostek inhibitora RN-az – RNASIN (Promega, Niemcy), 500 μM buforu do reakcji RT (Promega, Niemcy), deoksynukleozydotrifosforany (Fermentas, Litwa) i wodę dodaną do końcowej objętości 10 μl .

3. Oznaczanie ilości transkryptu metodą PCR w czasie rzeczywistym

W celu ilościowej analizy mRNA genu *TGF- β 1*, otrzymanego jak opisano w pkt 2, użyto 0,5 μl roztworu cDNA (ekwiwalent 40 ng RNA) w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, wykorzystując primery TGF- β 1: 5'-CAG CAA CAA TTC CTG GCG ATA CC-3' oraz TGF β -2: 5'-CGA AAG CCC TCA ATT TCC CCT C-3'. Pomiar ilości wyjściowego transkryptu *TGF- β 1* dokonano w oparciu o porównanie wyniku analogicznej amplifikacji dla genu metabolizmu podstawowego, β -aktyny. Zastosowano primery: *bact1-1*: 5'-TGT GCC CAT CTA CGA GGG GTA TGC-3' oraz *bact1-2*: 5'-GGT ACA TGG TGG TGC CGC CAG ACA-3'. W obu reakcjach użyto primerów w stężeniu 10 nM. Do przeprowadzenia analizy wykorzystano zestaw iQSybrGreen Supermix[®] (Bio-Rad, USA), zawierający 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH=8,4; 0,2 mM DTP, 0,025 jednostki/ μl polimerazy Taq, 3 mM MgCl₂, Sybr Green i 20 nM fluoresceiny. Używano aparatu iCyclerIQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) oraz 96-dółkowych (0,2 ml) płytek typu „*non-skirted*” do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (BIOplastic, Holandia). Profil czasowy i temperaturowy poszczególnych reakcji został przedstawiony w tabeli 3.

Tab. 3. Parametry reakcji PCR w czasie rzeczywistym, wykorzystywanej do analizy ilości transkryptów genów kodujących β -aktynę i TGF- β 1

Tabl. 3. Real-time PCR reaction parameters for analysis of transcripts of β -actin and TGF- β 1 genes

Etap reakcji <i>Reaction stage</i>		Temperatura i czas trwania <i>Temperature and time</i>	
		Gen β -aktyny <i>β-actin gene</i>	Gen TGF- β 1 <i>TGF-β1 gene</i>
1	Wstępna denaturacja / <i>Initial denaturation</i>	95 °C, 3 min	95 °C, 3 min
2	Właściwa denaturacja / <i>Main denaturation</i>	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s
3	Przylączenie starterów / <i>Annealing</i>	61 °C, 30 s	59 °C, 30 s
4	Wydłużanie / <i>Extention</i>	72 °C, 35 s	72 °C, 15 s
5	Odczyt fluorescencji / <i>Detection of fluorescence</i>	82 °C, 5 s	77 °C, 5 s

W przypadku genu kodującego β -aktynę liczba cykli wynosiła 35, natomiast dla genu kodującego TGF- β 1 – 37. Uzyskiwano produkty wielkości odpowiednio: 424 i 132 par zasad (pz) Dla każdej próby przeprowadzono dwie reakcje w jednej serii. Homogenność produktów reakcji sprawdzano wyznaczając krzywą topnienia po każdej reakcji PCR. Pomiar wydajności amplifikacji (zmianę fluorescencji Sybr Green I) oraz analizę ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania iCycler IQ Software v. 3.1. W celu oznaczenia względnej ilości mRNA genu TGF- β 1, uzyskany wynik porównywano z analogiczną reakcją dla transkryptu β -aktyny. Ostatecznie obliczenia poziomu ekspresji genu TGF- β 1 dokonano w stosunku do mRNA β -aktyny (*bact*) wg następującego wzoru: $TGF-\beta/bact (\%) = 2^{-\Delta Ct} \times 100\%$, gdzie $\Delta Ct = Ct_{TGF-\beta} - Ct_{bact}$. [148, 221].

Badania przeprowadzono w Katedrze Histologii i Immunologii AMG (kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Mysliwski).

3.2.2.6. Oznaczanie polimorfizmów genu kodującego TGF- β 1

Pełną analizę czterech badanych polimorfizmów genu TGF- β 1 przeprowadzono stosując technikę CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*). Jest to metoda służąca do wykrywania polimorfizmów w danym *locus* i przeprowadzana jest w następujących etapach:

- Izolacja DNA,
- Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR,
- Elektroforeza agarozowa produktów amplifikacji,
- Trawienie produktów PCR enzymami restrykcyjnymi,
- Rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych [221, 222, 241].

Izolacja DNA z krwi

Krew w warunkach jałowych, w trakcie wykonywania innych, koniecznych badań, pobierano do probówek zawierających EDTA. Materiał przechowywano w temperaturze -20°C do chwili wykonywania oznaczeń.

Izolację DNA z 200 µl krwi przeprowadzano przy wykorzystaniu komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Niemcy) według procedury dołączonej do zestawu. Wszystkie etapy przeprowadzano w temperaturze pokojowej, z wyjątkiem 10 minutowej inkubacji w temperaturze 56°C. Otrzymany roztwór DNA przechowywano w temperaturze –20°C do czasu dalszej analizy.

Amplifikacja DNA metodą PCR

Reakcje PCR przeprowadzano w celu amplifikacji wybranych odcinków genu *TGF-β1* poddawanych analizie restrykcyjnej w dalszych etapach pracy.

Dla każdej z próbek DNA wyizolowanego z krwi amplifikowano dwa fragmenty:

- fragment eksonu 1 genu *TGF-β1* amplifikowano z użyciem starterów TGF1 o sekwencji 5'-TTC CCT CGA GGC CCT CCT A-3' (Starter 1) oraz TGF2 o sekwencji 5'-GCC GCA GCT TGG ACA GGA TC-3' (Starter 2)
- fragment regionu promotorowego genu *TGF-β1* amplifikowano z użyciem starterów TGF3 o sekwencji 5'-GGG GAC ACC ATC TAC AGT G-3' (Starter 1') oraz TGF4 o sekwencji 5'-GGA GGA GGG GGC AAC AGG-3' (Starter 2')

Startery DNA wykorzystywane w reakcjach amplifikacji DNA metodą PCR zostały zsintetyzowane przez firmę ThermoElectron Corporation (Niemcy). Reakcję PCR przeprowadzano w całkowitej objętości 25 µl. W tabeli 4 przedstawiono skład pojedynczej mieszaniny reakcyjnej.

Tab. 4. Skład mieszaniny reakcyjnej

Tabl. 4. Reaction mixture composition

Składnik mieszaniny / <i>Reaction mixture composition</i>	Objętość (µl) <i>Volume (µl)</i>
Bufor reakcyjny 10x stężony [Sigma] / <i>Reaction Buffer 10x concentrated</i>	2,5
dNTP (2 mM) [Sigma]	2,5
Starter 1 lub / <i>or 1'</i> (20 µM)	0,25
Starter 2 lub / <i>or 2'</i> (20 µM)	0,25
Polimeraza DNA – REDTaq™ / <i>Genomic DNA Polymerase</i> (1 U/µl) [Sigma]	1,0
Matryca DNA (50 ng/ml) / <i>DNA template</i>	5,0
Woda redestylowana, jałowa / <i>Sterile, distilled water</i>	13,5

Reakcja amplifikacji DNA metodą PCR odbywała się w termocyklerze (Mastercycler 5333, Eppendorf) według odpowiedniego programu (tab. 5).

Tab. 5. Program do amplifikacji
 Tabl. 5. Amplification program parameters

Etap Stage	Proces / Process	Temp. [°C] Temp.	Czas / Time [min]	
1.	Wstępna denaturacja / <i>Initial denaturation</i>	95	5,00	x 35 cykli / cycles
2.	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	95	0,50	
3.	Łączenie starterów / <i>Annealing</i>	60,5	1,00	
4.	Wydłużanie / <i>Extention</i>	72	1,00	
5.	Końcowe wydłużanie / <i>Terminal extention</i>	72	7,00	

Amplifikacji poddawano zazwyczaj kilka próbek jednocześnie. W tym celu przygotowywano mieszaninę, która zawierała zwielokrotnione ilości buforu reakcyjnego, nukleotydów, starterów, polimerazy i wody (tzw. *master-mix*). Tak przygotowaną mieszaninę porcjowano do probówek i dodawano matrycę DNA.

Elektroforeza agarozowa produktów amplifikacji

Technika elektroforezy służy do rozdzielania molekuł na podstawie ich wielkości. Używany bufor do elektroforezy o odpowiednim pH ma takie właściwości, że rozdzielane molekuły mają ujemny wypadkowy ładunek elektryczny. DNA przemieszcza się w polu elektrycznym od elektrody ujemnej (–) do dodatniej (+) i wędrując przez pory w żelu ulega rozdziałowi ze względu na swoją wielkość.

Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji prowadzono w 1,5% żelach agarozowych przygotowanych w buforze 0,5 x TBE zawierającym 110 mM Tris, 90 mM kwas borowy, 2,5 mM EDTA o pH 8,3 (podano końcowe stężenia składników buforu). Rozdział prowadzono w przeznaczonym do tego celu aparacie w polu elektrycznym o napięciu 5 V na 1 cm długości żelu w obecności bromku etydyny. Po zakończeniu rozdziału żel oglądano na transiluminatorze emitującym światło ultrafioletowe o długości fali $\lambda=320$ nm.

Analiza restrykcyjna polimorfizmów w genie *TGF- β 1*

Trawienie enzymami restrykcyjnymi produktów amplifikacji dwóch fragmentów genu *TGF- β 1* umożliwiło identyfikację poszczególnych alleli powyższego genu. Analizie restrykcyjnej poddawano:

- fragment eksonu 1 genu *TGF- β 1* (produkt amplifikacji ze starterami TGF1 i TGF2) – identyfikacja polimorfizmu T869C (enzym MspA1I) oraz polimorfizmu G915C (enzym BglI),
- fragment regionu promotorowego genu *TGF β 1* (produkt amplifikacji ze starterami TGF3 i TGF4) – identyfikacja polimorfizmu G-800A (enzym MaeIII) oraz polimorfizmu C-509T (enzym Eco81I).

Charakterystykę używanych enzymów restrykcyjnych przedstawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Charakterystyka używanych enzymów restrykcyjnych
 Tabl. 6. Restriction enzyme characteristics

Nazwa enzymu restrykcyjnego <i>Restriction enzyme</i>	Sekwencja kanoniczna rozpoznawana przez enzym <i>Consensus sequence recognized by enzyme</i>	Analizowany polimorfizm <i>Polymorphism analyzed</i>	Optymalna temperatura działania <i>Optimal temperature</i>
MspAII	5'-CMG↓CKG-3' 3'-GMC↑GKC-5'	T869C	37 °C
BglII	5'-GCCNNNN↓NGGC-3' 3'-CGGN↑NNNNCCG-5'	G915C	37 °C
MaeIII	5'-↓GTNAC-3' 3'-CANTG↑-5'	G-800A	55 °C
Eco8II	5'-CC↓TNAGG-3' 3'-GGANT↑CC-5'	C-509T	37 °C

M – A lub / or C (adenina lub cytozyna; *adenine or cytosine*)

K – G lub / or T (guanina lub tymina; *guanine or thymine*)

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzano w całkowitej objętości 20 µl. Reakcja odbywała się w temperaturze specyficznej dla danego enzymu restrykcyjnego w czasie 14-16 godzin. Matrycę DNA stanowiły produkty reakcji PCR przeprowadzonej we wcześniejszych etapach. Skład mieszanin reakcyjnych dla poszczególnych enzymów restrykcyjnych zestawiono w tabeli 7.

Tab. 7. Skład mieszanin reakcyjnych dla poszczególnych enzymów restrykcyjnych
 Tabl. 7. Composition of reaction mixtures for each restriction enzyme

Składniki mieszaniny <i>Reaction mixture components</i>	Enzym / Enzyme			
	MspAII [Fermentas]	BglII [Promega]	MaeIII [Promega]	Eco8II [Fermentas]
Bufor reakcyjny / <i>Reaction buffer</i>	2 µl	2 µl	10 µl	2 µl
BSA (Promega) <i>Bovine serum albumine</i>	0,2 µl	–	–	–
Enzym restrykcyjny <i>Restriction enzyme</i> (10 U/µl)	0,2 µl	0,5 µl	0,2 µl	0,4 µl
Matryca DNA / <i>DNA template</i>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O jałowa / <i>Sterile water</i>	7,6 µl	7,5 µl	–	7,6 µl

Produkty trawienia rozdzielano w 2,5% lub 3% żelach agarozowych w buforze 0,5 x TBE w polu elektrycznym o napięciu 5 V na 1 cm długości żelu w obecności bromku etydyny. Po zakończeniu rozdzielania żel oglądano na transiluminatorze emitującym światło ultrafioletowe o długości fali $\lambda = 320$ nm.

Charakterystyka oczekiwanych produktów uzyskanych w wyniku cięcia enzymami restrykcyjnym została przedstawiona w tabelach 8 oraz 9.

Tab. 8. Polimorfizm w eksonie 1 genu *TGF-β1*

Tabl. 8. *TGF-β1 gene, exon 1 polymorphism*

Polimorfizm <i>Polymorphism</i> T869C (kodon 10, <i>codon</i> 10)	Długość produktu amplifikacji <i>Length of amplification product</i>	Długość fragmentów restrykcyjnych / <i>Length of restriction fragments</i>
Homozygota TT <i>TT homozygote</i>	294 pz / bp	161, 67, 40, 26 pz / bp
Homozygota CC <i>CC homozygote</i>		149, 67, 40, 26, 12 pz / bp
Polimorfizm <i>polymorphism</i> G915C (kodon 25, <i>codon</i> 25)	Długość produktu amplifikacji <i>Length of amplification product</i>	Długość fragmentów restrykcyjnych / <i>Length of restriction fragments</i>
Homozygota GG <i>GG homozygote</i>	294 pz / bp	131, 103, 60 pz / bp
Homozygota CC <i>CC homozygote</i>		163, 131 pz / bp

Tab. 9. Polimorfizm w regionie promotorowym genu *TGF-β1*

Tabl. 9. *TGF-β1 gene polymorphism in promotor region*

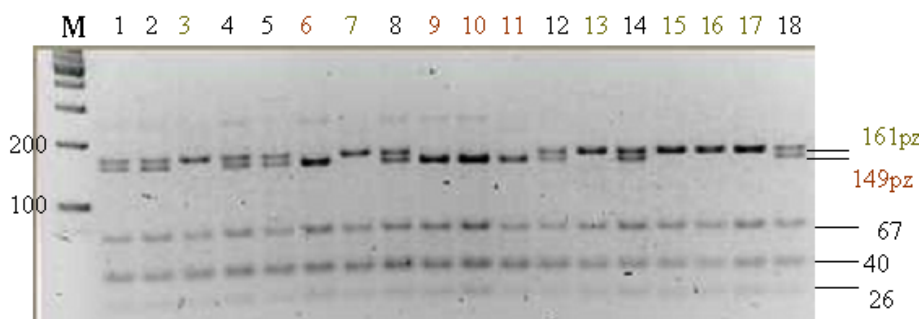
Polimorfizm <i>polymorphism</i> G-800A	Długość produktu amplifikacji <i>Length of amplification product</i>	Długość fragmentów restrykcyjnych / <i>Length of restriction fragments</i>
Homozygota GG <i>GG homozygote</i>	455 pz / bp	205, 137, 113 pz/bp
Homozygota AA <i>AA homozygote</i>		342, 113 pz / bp
Polimorfizm <i>polymorphism</i> C-509T	Długość produktu amplifikacji <i>Length of amplification product</i>	Długość fragmentów restrykcyjnych / <i>Length of restriction fragments</i>
Homozygota CC <i>CC homozygote</i>	455 pz / bp	429, 26 pz / bp
Homozygota TT <i>TT homozygote</i>		455 pz / bp

Zamplifikowane fragmenty genu *TGF-β1* poddawano trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi w celu wykrycia polimorfizmów tego genu.

Uzyskany po amplifikacji eksonu 1 genu *TGF-β1* odcinek DNA o długości 294 par zasad poddano analizie restrykcyjnej enzymami MspA II oraz BglI.

Polimorfizm T869C – trawienie enzymem MspAII

Trawienie enzymem restrykcyjnym MspAII umożliwiło wykrycie substytucji tyminy na cytozynę w pozycji +869 (T869C). Homozygota TT charakteryzuje się długością 161, 67, 40 i 26 pz, natomiast homozygota CC występuje w postaci odcinków o długościach 149, 67, 40, 26 i 12 pz. W przypadku heterozygoty obserwuje się produkty trawienia o długości 161, 149, 67, 40, 26 i 12 pz. Obraz po rozdzieleniu fragmentów restrykcyjnych przedstawia rycina 5.



Ryc. 5. Rozdział fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem MspAII produktu PCR w celu określenia genotypu w pozycji 869 genu *TGF-β1*

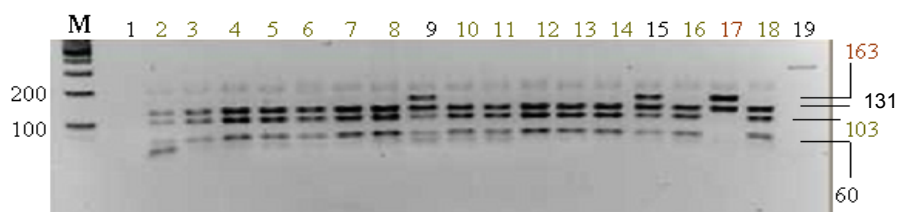
Fig. 5. Electrophoresis of restriction enzyme fragments after PCR product digestion by enzyme MspAII to analyze genotype of the *TGF-β1* gene at position 869

Nr ścieżki / Lane number

M	– wzorzec masowy / molecular weight ladder
3,7,13,15-17	– homozygota TT / TT homozygote
1,2,4,5,8,12,14,18	– heterozygota / heterozygote
6, 9-11	– homozygota CC / CC homozygote

Polimorfizm G915C – trawienie enzymem BglII

Trawienie enzymem BglII umożliwiło odróżnienie genotypu w badanym polimorfizmie G915C. W przypadku homozygoty GG widoczne były w żelu prążki o długości 131, 103 i 60 pz, homozygota CC charakteryzuje się długością 163 i 131 pz. Heterozygota to odcinki o długościach 163, 131, 103 i 60 pz. Obraz po rozdzieleniu fragmentów restrykcyjnych przedstawia rycina 6.



Ryc. 6. Rozdział fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem BglII produktu PCR w celu określenia genotypu w pozycji 915 genu *TGF-β1*

Fig. 6. Electrophoresis of restriction enzyme fragments after PCR product digestion by enzyme BglII to analyze genotype of the *TGF-β1* gene at position 915

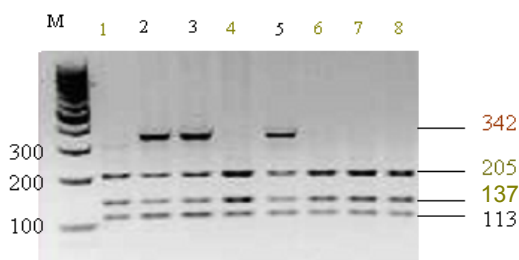
Nr ścieżki / Lane number

M	– wzorzec masowy / molecular weight ladder
3,7,13,15-17	– homozygota GG / GG homozygote
1,2,4,5,8,12,14,18	– heterozygota / heterozygote
6, 9-11	– homozygota CC / CC homozygote
19	– kontrola PCR / PCR control

Uzyskany po amplifikacji rejonu promotorowego genu *TGF-β1* odcinek DNA o długości 455 par zasad poddano analizie restrykcyjnej enzymami MaeIII oraz Eco8II.

Polimorfizm G-800A – trawienie enzymem MaeIII

Trawienie restrykcyjnym enzymem MaeIII umożliwiło wykrycie zamiany guaniny na adeninę w pozycji –800 (G-800A). W przypadku homozygoty GG obserwuje się produkty trawienia o długości 205, 137 i 113 pz, natomiast u homozygoty AA występują produkty o długościach 342 i 113 pz. Heterozygoty odznaczają się długością 342, 205, 137 i 113 pz. Obraz po rozdzieleniu fragmentów restrykcyjnych przedstawia rycina 7.



Ryc. 7. Rozdział fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem Mae III produktu PCR w celu określenia genotypu w pozycji –800 genu *TGF-β1*

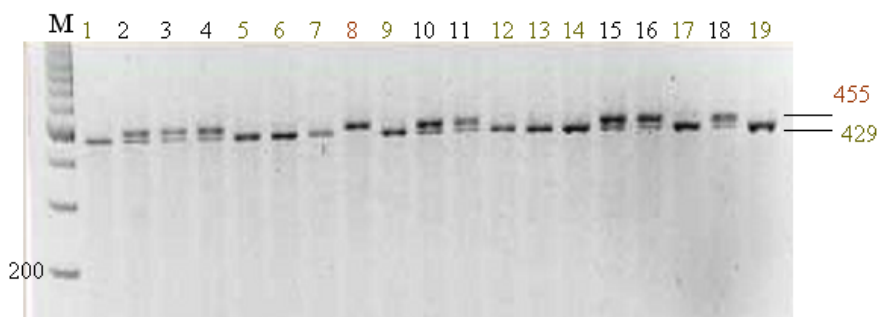
Fig. 7. Electrophoresis of restriction enzyme fragments after PCR product digestion by enzyme Mae III to analyze genotype of the *TGF-β1* gene at position –800

Nr ścieżki / Lane number

- | | |
|-------------|--|
| M | – wzorzec masowy / molecular weight ladder |
| 1, 4, 6-8 | – homozygota GG / GG homozygote |
| 2, 3, 5 | – heterozygota / heterozygote |
| brak / none | – homozygota CC / CC homozygote |

Polimorfizm C-509T – trawienie enzymem Eco81I

W przypadku polimorfizmu C-509T charakterystyczne jest utworzenie miejsca cięcia dla enzymu Eco81I. Homozygota CC nie ulega trawieniu i występuje w postaci odcinka o długości 455 pz, natomiast homozygota TT daje odcinki o długościach 429 i 26 pz. W przypadku heterozygoty produktem trawienia są odcinki o długości 455, 429 i 26 pz. Obraz po rozdziale fragmentów restrykcyjnych przedstawia rycina 8.



Ryc. 8. Rozdział fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem Eco81I produktu PCR w celu określenia genotypu w pozycji -509 genu *TGF-β1*

Fig. 8. Electrophoresis of restriction enzyme fragments after PCR product digestion by enzyme Eco81I to analyze genotype of the *TGF-β1* gene at position -509

Nr ścieżki / Lane number

M	– wzorzec masowy / molecular weight ladder
1,5-7,9,12-14,17,19	– homozygota CC / CC homozygote
2-4,10,11,15,16,18	– heterozygota / heterozygote
8	– homozygota TT / TT homozygote

Oznaczenie polimorfizmu genu kodującego TGF-β1 wykonano w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego (kierownik: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn).

Na przeprowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

3.2.2.7. Metody analizy statystycznej

Ocenę rozkładu parametrów ilościowych przeprowadzono w oparciu o analizę histogramów oraz test Shapiro-Wilka. Za względu na fakt, że rozkład analizowanych parametrów różnił się statystycznie znamienne od rozkładu normalnego do analizy wykorzystano testy nieparametryczne: test Manna-Whitney'a do porównania dwóch grup, test ANOVA Kruskal-Wallisa oraz test korelacji rang Spearmana do porównania wielu grup. Na wykresach przedstawiono wartość mediany, pierwszego i trzeciego kwartyłu (25 i 75 percentyl) oraz wartości najmniejsze i największe.

Analizę regresji wieloczynnikowej przeprowadzono metodą standardową, krokowo postępującą i krokowo wsteczną, porównując spójność wyników między nimi. W wynikach analiz podano współczynniki beta wraz z ich błędem standardowym (SE) oraz 95% przedziałem ufności. Względna siłę związków poszczególnych czynników niezależnych ze zmienną zależną przedstawiono na wykresach Pareto.

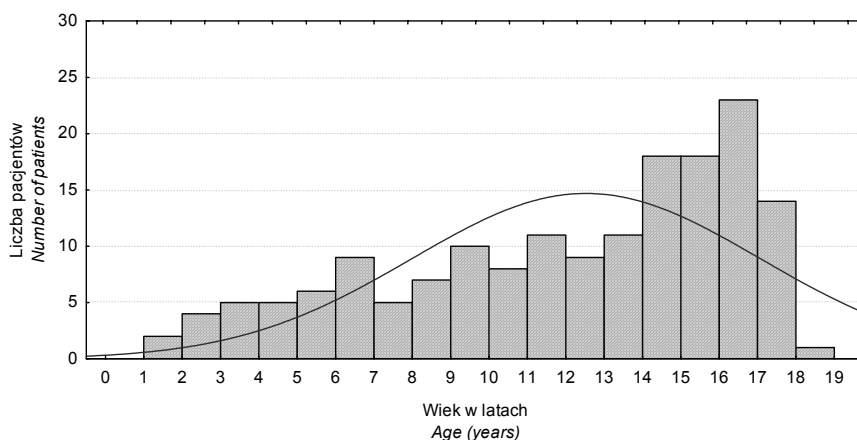
Do porównania parametrów jakościowych wykorzystano test Personna χ^2 wprowadzając poprawkę Yatesa, gdy liczebność oczekiwana podgrupy była mniejsza od 10.

W wynikach analiz statystycznych podano obliczony poziom istotności statystycznej (p) weryfikowanej hipotezy zerowej; wartości $p < 0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie. Obliczenia wykonano z użyciem pakietu oprogramowania statystycznego Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., USA, 2005).

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka badanych

Analizie poddano 167 pacjentów, w tym 97 chłopców (58,1%) oraz 70 dziewcząt (41,9%). Wiek badanych mieścił się w przedziale od 1,5 do 18,4 lat (średnio $12,5 \pm 4,5$, mediana 14,0 lat).



Ryc. 9. Rozkład wieku w badanej grupie dzieci
 Fig. 9. Histogram of the age of children in the study group

Rozkład wieku różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p < 0,001$) (ryc. 9). W grupie kontrolnej (K) były 42 osoby (25,1%), w grupie dzieci z przewlekłymi zapaleniami wątroby (PZW – HBV przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B, HCV przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C i AIH autoimmunologiczne zapalenie wątroby) – 21 pacjentów (12,6%), zaś w grupie chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit (NZJ – UC wrzodziejące zapalenie jelita grubego i CD choroba Leśniowskiego-Crohna) – 104 pacjentów (62,3%). Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy dotyczącej wieku pacjentów pomiędzy poszczególnymi grupami (NZJ, PZW, K) ($p = 0,11$) oraz podgrupami badanych ($p = 0,34$) (tab. 10).

Tab. 10. Wiek pacjentów (lata) w poszczególnych grupach i podgrupach badanych
 Tabl. 10. Age of children in the study groups and subgroups (years)

Grupa badana <i>Study group</i>	N	Średni wiek <i>Mean age</i>	Mediana <i>Median</i>	Min.	Max	SD
K / <i>Control</i>	42	11,0	11,0	2,0	18,0	5,0
PZW / <i>Ch.h</i>	21	13,0	13,0	6,0	18,0	3,0
AIH	7	12,7	15,0	6,0	17,0	4,0
HBV	10	13,6	13,0	11,0	18,0	2,1
HCV	4	12,3	12,5	8,0	16,0	3,9
NZJ / <i>IBD</i>	104	13,0	14,5	1,5	18,4	4,5
UC	68	13,1	14,0	4,0	18,4	4,4
CD	36	12,9	15,0	1,5	18,0	4,8
Razem / <i>Total</i>	167					

W badanej grupie dzieci nie obserwowano statystycznie istotnych różnic częstości występowania płci żeńskiej lub męskiej pomiędzy analizowanymi grupami ($p=0,06$) i podgrupami badanych ($p=0,06$) (tab. 11).

Tab. 11. Płeć dzieci w poszczególnych grupach badanych
 Tabl. 11. Gender of children in the study groups

Grupa badana <i>Study group</i>	Płeć męska (M) <i>Boys</i>	Płeć żeńska (K) <i>Girls</i>	Razem <i>Total</i>
NZJ / <i>IBD</i>	67 (64,42%)	37 (35,58%)	104
UC	41 (60,29%)	27 (39,71%)	68
CD	26 (72,22%)	10 (27,78%)	36
PZW / <i>Ch.h</i>	8 (38,10%)	13 (61,90%)	21
AIH	4 (57,14%)	3 (42,86%)	7
HBV	4 (40%)	6 (60%)	10
HCV	0 (0%)	4 (100%)	4
K / <i>Control</i>	22 (52,38%)	20 (47,62%)	42

4.1.1. Pacjenci z nieswoistymi zapaleniami jelit (NZJ)

4.1.1.1. Aktywność kliniczna choroby

W ocenie stopnia ciężkości przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC) wykorzystywano skalę Truelove'a-Witts'a, a w przypadkach choroby Leśniowskiego-Crohna (CD) zastosowano skalę wg Hyamsa w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego (PCDAI – *Pediatric Crohn's Disease Activity Index*).

W celu uproszczenia analizy statystycznej dotyczącej oceny aktywności choroby, nie korzystano z bezwzględnych wartości punktowych wyliczonych dla poszczególnych

chorych. Pacjentów zakwalifikowano natomiast do jednej z 4 niżej podanych grup aktywności choroby (kryteria zaliczenia badanych do poszczególnych grup podano w rozdziale „Pacjenci i metody”). W opracowaniu statystycznym dla poszczególnych stopni aktywności choroby (zarówno dla NZJ, UC i CD) wprowadzono podane poniżej oznakowania numeryczne.

- Brak aktywności = 0
- Postać łagodna = 1
- Postać umiarkowana = 2
- Postać ciężka = 3

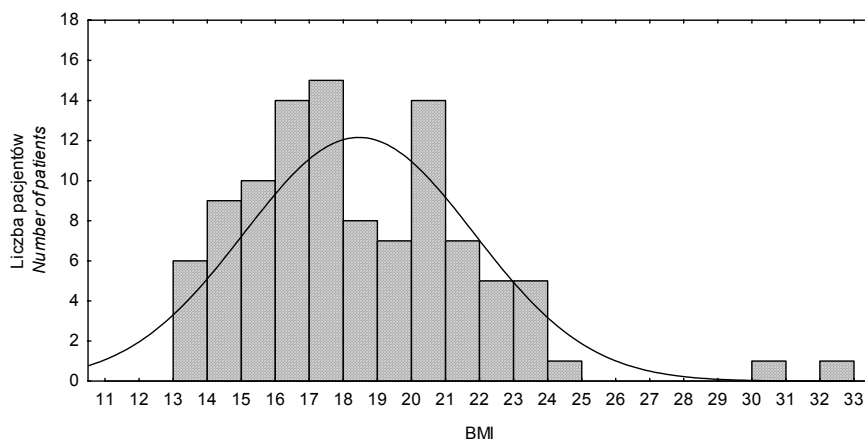
Liczbę pacjentów, u których zdefiniowano poszczególne stopnie aktywności choroby dla całej grupy badanych z NZJ (N=104) przedstawiono w tabeli 8. W grupie pacjentów z UC statystycznie częściej stwierdzano wyższe stopnie aktywności choroby w porównaniu z pacjentami, u których rozpoznawano CD ($p < 0,001$) (tab. 12).

Tab. 12. Pacjenci z NZJ w poszczególnych stopniach aktywności choroby w zależności od rodzaju NZJ
 Tabl. 12. Disease activity in IBD patients depending on subgroups of IBD

Stopień aktywności <i>Disease activity</i>	Liczba pacjentów / <i>Number of patients</i>		
	NZJ / <i>IBD</i>	UC	CD
0	12 (11,53%)	0 (0%)	12 (100%)
1	67 (64,43)	46 (68,66%)	21 (31,34%)
2	17 (16,35)	15 (88,24%)	2 (11,76%)
3	8 (7,69)	6 (75%)	2 (25%)
Razem / <i>Total</i>	104 (100%)	67	37

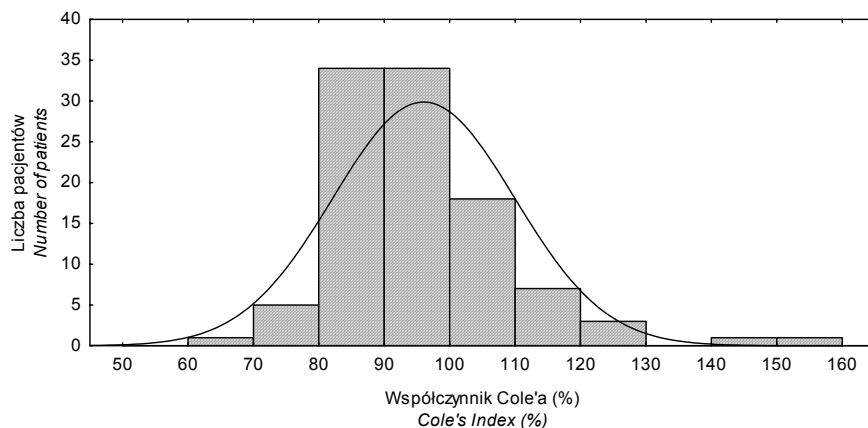
4.1.1.2. Ocena stanu odżywienia pacjentów z NZJ

W grupie badanych z NZJ współczynnik BMI (*Body Mass Index*) wahał się od 13,02 do 32,19 (średnia $18,46 \pm 3,38$; mediana 17,99), natomiast współczynnik Cole'a mieścił się od 67,0 do 151,1% (średnia $96,0 \pm 13,9\%$; mediana 94,2%). Rozkład wartości dla obu badanych parametrów różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p < 0,001$) (ryc. 10 i 11).



Ryc. 10. Rozkład wartości BMI w grupie dzieci z NZJ

Fig. 10. BMI value in IBD group



Ryc. 11. Rozkład wartości współczynnika Cole'a (%) w grupie pacjentów z NZJ

Fig. 11. Cole's Index (%) in IBD group

W zakresie BMI nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy poszczególnymi rodzajami schorzeń w grupie pacjentów z NZJ ($p=0,18$), natomiast wykazano statystycznie istotną różnicę w zakresie wartości współczynnika Cole'a pomiędzy pacjentami z UC i CD ($p<0,05$). Średnia wartość współczynnika Cole'a była wyższa w grupie chorych z UC (tab. 13).

Tab. 13. Wartości współczynnika BMI i Cole'a (%) w podgrupach chorych z NZJ
 Tabl. 13. BMI value and Cole's Index (%) in IBD subgroups

	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
UC/BMI	68	18,81	18,12	13,23	32,19	3,59
UC/w. Cole'a UC / Cole's Index	68	98,08	96,76	73,72	151,10	14,52
CD/BMI	36	17,77	17,51	13,02	23,12	2,85
CD/w. Cole'a CD / Cole's Index	36	92,17	89,49	66,96	127,26	11,88

4.1.1.3. Ocena stanu odżywienia a poziom białka całkowitego i albuminy w surowicy krwi u pacjentów z NZJ

W całej grupie pacjentów z NZJ nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy poziomu białka całkowitego ani albuminy w zależności od stanu odżywienia – dla wsp. Cole'a odpowiednio: $p=0,11$ i $p=0,53$ dla BMI odpowiednio: $p=0,22$ i $p=96$. Również w zakresie podgrup chorych z UC i CD nie wykazano takich zależności.

4.1.1.4. Pacjenci z NZJ a faza choroby

Pacjentów z NZJ (UC oraz CD) zakwalifikowano do jednej z 3 faz choroby, w zależności od tego, w jakim byli okresie schorzenia się w chwili włączenia do badań. Wyróżniono 3 następujące fazy choroby:

- Początek – P
- Nawrót – N
- Badanie kontrolne w okresie remisji choroby – K/R

Zdecydowana większość badanych (P+N – 82,7%) znajdowała się w aktywnym okresie choroby (tab. 14).

Tab. 14. Fazy choroby u pacjentów z NZJ
 Tabl. 14. Stage of disease in IBD group

Podgrupa NZJ Subgroup of IBD	Liczba badanych / Number of patients			
	P / Presentation	N / Relapse	K/R / Remission	Razem / Total
UC	33 (48,53%)	24 (35,29%)	11 (16,18%)	68
CD	10 (27,78%)	19 (52,78%)	7 (19,44%)	36
Razem / Total	43 (41,35%)	43 (41,35%)	18 (17,30%)	104

4.1.1.5. Analiza objawów klinicznych u pacjentów z NZJ

Spośród analizowanych objawów klinicznych, obie podgrupy (UC i CD) różniły się jedynie częstością występowania krwi w stolcu. Objaw ten występował zdecydowanie częściej u chorych z UC ($p=0,01$) (tab. 15).

Tab. 15. Objawy kliniczne u pacjentów z NZJ
 Tabl. 15. Clinical symptoms in IBD patients

Objawy kliniczne <i>Clinical symptoms</i>	UC	CD	Razem <i>Total</i>	Poziom p <i>P-level</i>
Biegunka <i>Diarrhoea</i>	36 (63,16%)	21 (36,84%)	57	p=0,60
Krew w stolcu <i>Blood in stools</i>	43 (76,79%)	13 (23,21%)	56	p=0,01
Gorączka <i>Fever</i>	5 (71,43%)	2 (28,57%)	7	p=0,95
Ubytek masy ciała <i>Weight loss</i>	3 (42,86%)	4 (57,14%)	7	p=0,38
Bóle brzucha <i>Abdominal pain</i>	19 (57,58%)	14 (42,42%)	33	p=0,36
Oslabienie <i>Weakness</i>	2 (50%)	2 (50%)	4	p=0,90
Zaparcia <i>Constipation</i>	0 (0%)	1 (100%)	1	p=0,75
Bładość (niedokrwistość) <i>Pallor (Anaemia)</i>	2 (66,67%)	1 (33,33%)	3	p=0,60
Bóle stawów <i>Arthralgia</i>	1 (100%)	0 (0%)	1	p=0,75
Wymioty <i>Vomits</i>	1 (100%)	0 (0%)	1	p=0,75

4.1.1.6. Analiza wyników badań endoskopowych i histologicznych wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z NZJ

Poniżej przedstawiono wyniki badań endoskopowych i histopatologicznych wycinków błony śluzowej jelita dla pacjentów z UC i CD. Kwalifikację oceny zarówno endoskopowej, jak i histologicznej chorych z NZJ (CD i UC) przeprowadzono w oparciu o kryteria Porto [91] (tab. 16 i 17).

Tab. 16. Wyniki badań histopatologicznych wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z UC i CD
Tabl. 16. Results of histopathological examination in UC and CD patients

Stopień zaawansowania zmian histopatologicznych <i>Stage of histopathological changes</i>	UC	CD
0	8 (11,76%)	5 (13,89%)
1	32 (47,06%)	13 (36,11%)
2	24 (35,30%)	15 (41,67%)
3	4 (5,88%)	3 (8,33%)
Razem / <i>Total</i>	68 (100%)	36 (100%)

Tab. 17. Wyniki badań endoskopowych dla chorych z UC i CD
Tabl. 17. Results of colonoscopy examination in UC and CD patients

Stopień <i>Level</i>	UC	CD
0	3 (4,41%)	2 (5,55%)
1	38 (55,89%)	15 (41,67%)
2	23 (33,82%)	15 (41,67%)
3	4 (5,88%)	4 (11,11%)
Razem / <i>Total</i>	68 (100%)	36 (100%)

Zgodność wyników badań histopatologicznych z badaniami endoskopowymi przedstawiono oddzielnie dla podgrupy UC i dla CD, obserwując jedynie średni stopień zgodności (odpowiednio kappa=0,565 dla UC oraz kappa=0,578 dla CD), przedstawiają to odpowiednio tabele numer 18 i 19.

Tab. 18. Zgodność wyników badań histopatologicznych (HP) wycinków błony śluzowej jelita z badaniami endoskopowymi (K) w podgrupie chorych z UC

Tabl. 18. Correlation of histopathological (HP) and colonoscopy examinations (K) in UC group

Wynik HP Result HP	Wynik K Result K 0	Wynik K Result K 1	Wynik K Result K 2	Wynik K Result K 3	N (%)
0	2 (2,94%)	6 (8,82%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (11,76%)
1	1 (1,47%)	26 (38,24%)	5 (7,35%)	0 (0%)	32 (47,06%)
2	0 (0%)	5 (7,35%)	17 (25%)	2 (2,94%)	24 (35,29%)
3	0 (0%)	1 (1,47%)	1 (1,47%)	2 (2,94%)	4 (5,88%)
N (%)	3 (4,41%)	38 (55,88%)	23 (33,82%)	4 (5,88%)	68 (100%)

Tab. 19. Zgodność wyników badań histopatologicznych (HP) wycinków błony śluzowej jelita z badaniami endoskopowymi (K) w podgrupie chorych z CD

Tabl. 19. Correlation of histopathological (HP) and colonoscopy examinations (K) in CD group

Wynik HP Result HP	Wynik K Result K 0	Wynik K Result K 1	Wynik K Result K 2	Wynik K Result K 3	N (%)
0	1 (2,78%)	4 (11,11%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (13,89%)
1	1 (2,78%)	10 (27,78%)	2 (5,56%)	0 (0%)	13 (36,11%)
2	0 (0%)	1 (2,78%)	11 (30,56%)	3 (8,33%)	15 (41,67%)
3	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,56%)	1 (2,78%)	3 (8,33%)
N (%)	2 (5,56%)	15 (41,67%)	15 (41,67%)	4 (11,11%)	36 (100%)

4.1.1.7. Wyniki badań laboratoryjnych oraz ich porównanie między badanymi grupami i podgrupami chorych

Analizując wyniki badań dodatkowych w grupach dzieci (K, NZJ i PZW), wykazano: znamienne wyższą liczbę białych krwinek oraz stężenie CRP i wartości OB u pacjentów z NZJ w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: $p=0,03$, $p=0,006$, $p<0,001$) oraz niższe stężenie hemoglobiny i albuminy we krwi (odpowiednio: $p=0,03$, $p=0,006$). Ponadto u chorych z NZJ, w porównaniu z grupą kontrolną i pacjentami z PZW, stwierdzono:

znamiennie niższy poziom żelaza w surowicy krwi (vs. K: $p<0,001$, vs. PZW: $p=0,002$), niższe stężenie białka całkowitego w surowicy (vs. K: $p=0,001$, vs. PZW: $p=0,001$), wyższy odsetek granulocytów obojętnochłonnych (vs. K: $p<0,001$, vs. PZW: $p=0,01$) i niższy odsetek limfocytów (vs. K: $p<0,001$, vs. PZW: $p=0,01$) w obrazie białokrwinkowym krwi obwodowej oraz wyższą liczbę płytek krwi (vs. K: $p<0,001$, vs. PZW: $p<0,001$).

U chorych z PZW wykazano znamienne statystycznie wyższą aktywność aminotransferaz oraz GGTP, w porównaniu z grupą kontrolną i pacjentami z NZJ (dla ALT – PZW vs. K: $p<0,001$, PZW vs. NZJ: $p<0,001$, dla AST – PZW vs. K: $p<0,001$, PZW vs. NZJ: $p<0,001$, dla GGTP – PZW vs. K: $p=0,002$, PZW vs. NZJ: $p=0,03$).

Analogiczną analizę przeprowadzono także dla badanych podgrup pacjentów. W obrębie grupy chorych z NZJ, dla pacjentów z CD i UC w porównaniu z grupą kontrolną wykazano: znamienne niższy poziom żelaza w surowicy krwi (UC vs. K: $p=0,002$, CD vs. K: $p<0,001$), niższe stężenie albuminy w surowicy (UC vs. K: $p=0,04$, CD vs. K: $p=0,006$) wyższą liczbę płytek krwi (UC vs. K: $p<0,001$, CD vs. K: $p<0,001$), wyższy odsetek granulocytów obojętnochłonnych (UC vs. K: $p=0,007$, CD vs. K: $p<0,001$) oraz niższy odsetek limfocytów (UC vs. K: $p=0,01$, CD vs. K: $p<0,001$) w obrazie białokrwinkowym krwi obwodowej. Natomiast jedynie podgrupa dzieci z CD różniła się statystycznie znamienne od grupy kontrolnej w zakresie: wyższej liczby białych krwinek ($p=0,02$), niższego stężenia hemoglobiny ($p=0,001$), niższych wartości hematokrytu ($p=0,008$), niższego poziomu białka całkowitego w surowicy krwi ($p=0,008$) oraz wyższego poziomu białka C-reaktywnego ($p<0,001$). Natomiast wartości OB różniły się statystycznie istotnie nie tylko w porównaniu z grupą kontrolną, ale również między grupami pacjentów z CD i UC i były wyższe u dzieci z CD (odpowiednio K vs. UC: $p<0,001$, K vs. CD: $p<0,001$, UC vs. CD: $p=0,02$).

W podgrupach pacjentów z PZW wykazano statystycznie znamienne wyższą aktywność ALT i AST we wszystkich badanych podgrupach w porównaniu z grupą kontrolną (dla ALT – K vs. AIH: $p<0,001$, K vs. HBV: $p<0,001$, K vs. HCV: $p=0,001$, dla AST – K vs. AIH: $p=0,004$, K vs. HBV: $p=0,02$, K vs. HCV: $p=0,01$). Oznaczając GGTP, stwierdzono wyższą aktywność tego enzymu u pacjentów z AIH i HCV w porównaniu z grupą kontrolną (K vs. AIH: $p=0,002$, K vs. HCV: $p=0,02$) oraz różnicę w tym zakresie między pacjentami z AIH i HBV ($p=0,03$). Wykazano także znamienne wyższy poziom białka całkowitego u pacjentów z AIH w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,04$).

Szczegółowe dane dotyczące badanych grup i podgrup pacjentów zamieszczono w tabelach 20, 21 i 22.

Tab. 20. Wyniki badań laboratoryjnych w badanych grupach dzieci
 Tabl. 20. Laboratory parameters in the study groups

	Mediana / Median Zakres / Range			P P-level		
	Kontrola Control	NZJ IBD	PZW Ch.h.	K vs.NZJ C vs. IBD	K vs. PZW C vs. Ch.h.	NZJ vs. PZW IBD vs. Ch.h.
N	42	104	21			
WBC (G/l)	7,1 (3,8-12,8)	7,9 (3,3-28,0)	6,71 (4,3-13,8)	0,03	0,52	0,05
Fe (ug/dl)	88,0 (38,0-201,0)	56,0 (3,0-220,0)	87,0 (36,0-124,0)	<0,001	0,83	0,002
Neutro (%)	53,0 (26,0-75,0)	62,0 (30,0-89,0)	55,0 (35,8-74,0)	<0,001	0,94	0,01
Eos (%)	3,0 (0-8,3)	2,3 (0-12,1)	2,5 (0-9,0)	0,51	0,82	0,69
Limf (%)	38,5 (15,0-61,0)	28,9 (2,5-58,4)	34,0 (18,0-53,0)	<0,001	0,83	0,006
Mono (%)	5,0 (1,0-8,0)	5,0 (2,0-11,0)	5,0 (3,0-13,0)	0,60	0,25	0,44
HGB (g/dl)	13,5 (10,5-16,2)	12,8 (7,8-16,5)	13,4 (10,9-16,2)	0,03	0,74	0,16
Hct (%)	39,2 (34-46,6)	37,8 (26-47,6)	38,5 (32,2-48,6)	0,09	0,58	0,41
PLT (G/l)	293 (145-536)	352 (125-732)	254 (128-348)	<0,001	0,20	<0,001
CRP (mg/l)	1,6 (0,2-8,5)	3,05 (0,1-212,0)	2,5 (0,6-35,0)	0,006	0,10	0,38
OB (mm/h) ESR (mm/h)	6 (6-12)	12 (1-105)	8 (4-82)	<0,001	0,06	0,07
ALT (U/l)	14 (6-31)	14 (4-217)	70 (14-963)	0,80	<0,001	<0,001
AST (U/l)	23 (6-42)	20 (11-200)	79 (19-808)	0,53	<0,001	<0,001
GGTP (U/l)	12 (8-23)	15 (6-640)	34 (9-372)	0,19	0,002	0,03
Białko calk. T. protein (g/l)	75,0 (61-83)	71,0 (44-86)	76,5 (72,0-87,0)	0,01	0,34	<0,001

	Mediana / Median Zakres / Range			P P-level		
	Kontrola Control	NZJ IBD	PZW Ch.h.	K vs.NZJ C vs. IBD	K vs. PZW C vs. Ch.h.	NZJ vs. PZW IBD vs. Ch.h.
Albumina Albumin (g/l)	43,0 (34,0-59)	39,0 (26,0-56,0)	40,0 (31,0-58,0)	0,006	0,15	0,35
IgA (g/l)	1,3 (0,36-3,9)	1,20 (0,06-4,7)	1,35 (0,68-2,45)	0,62	0,78	0,18
IgG (g/l)	10,7 (6,2-13,3)	13,14 (1,91-31,67)	14,84 (9,26-50,9)	0,14	0,01	0,14
IgM (g/l)	0,8 (0,7-1,26)	1,00 (0,53-2,10)	1,4 (0,91-2,13)	0,26	0,02	0,005
γ -glob (%)	12,8 (8,9-14,7)	15,90 (9,7-30,3)	15,35 (12,4-37,7)	0,02	0,02	0,74

Tab. 21. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie kontrolnej (K) i w podgrupach pacjentów z UC i CD
 Tabl. 21. Laboratory parameters in the control group and UC and CD patients

	Mediana / Median Zakres / Range			P P-level		
	Kontrola / Control	UC	CD	K vs. UC	K vs. CD	UC vs. CD
N	42	68	36			
WBC (G/l)	7,1 (3,8-12,8)	7,87 (3,3-27,9)	8,0 (5,8-16,3)	0,13	0,02	0,25
Fe (ug/dl)	88,0 (38,0-201,0)	62,0 (5,0-217,0)	37,0 (3,0-220,0)	0,002	<0,001	0,22
Neutro (%)	53,0 (26,0-75,0)	59,9 (30,0-89,0)	65,2 (39,0-87,1)	0,007	<0,001	0,18
Eos (%)	3,0 (0-8,3)	2,1 (0-12,1)	2,85 (0-9,0)	0,39	0,93	0,46
Limf (%)	38,5 (15,0-61,0)	30,0 (2,5-58,4)	23,4 (9,0-50,9)	0,01	<0,001	0,04
Mono (%)	5,0 (1,0-8,0)	4,7 (2,0-11,0)	5,0 (2,0-9,0)	0,72	0,51	0,72
HGB (g/dl)	13,5 (10,5-16,2)	13,2 (7,8-16,5)	12,5 (10,2-15,5)	0,25	0,001	0,08

	Mediana / Median Zakres / Range			P P-level		
	Kontrola Control	UC	CD	K vs. UC	K vs. CD	UC vs. CD
Hct (%)	39,2 (34,0-46,6)	38,6 (26-47,1)	37,1 (33,5-44,0)	0,43	0,008	0,09
PLT (G/l)	293 (145-536)	348 (174-664)	354 (125-732)	<0,001	<0,001	0,26
CRP (mg/l)	1,6 (0,2-8,5)	2,9 (0,2-219,0)	6,1 (0,1-83,5)	0,06	<0,001	0,12
OB (mm/h) ESR (mm/h)	6 (6-12)	12 (1-105)	24 (4-66)	<0,001	<0,001	0,02
ALT (U/l)	14 (6-31)	14 (4-217)	13 (4-138)	0,67	0,92	0,51
AST (U/l)	23 (6-42)	19 (11-200)	23 (11-102)	0,40	0,88	0,36
GGTP (U/l)	12 (8-23)	13 (6-640)	18 (12-346)	0,60	0,02	0,11
Białko calk. <i>T. protein</i> (g/l)	75,0 (61-83)	72,0 (44,0-86,0)	71,0 (46,0-86,0)	0,34	0,008	0,47
Albumina <i>Albumin</i> (g/l)	43,0 (34,0-59)	40,0 (26,0-56,0)	39,0 (26,0-46,0)	0,04	0,006	0,80
IgA (g/l)	1,3 (0,36-3,9)	1,20 (0,06-4,7)	1,28 (0,45-101)	0,59	0,74	0,82
IgG (g/l)	10,7 (6,2-13,3)	12,75 (4,18-24,3)	14,0 (1,91-31,67)	0,25	0,10	0,57
IgM (g/l)	0,8 (0,7-1,26)	0,94 (0,71-1,98)	1,05 (0,53-2,10)	0,16	0,67	0,92
γ -glob (%)	12,8 (8,9-14,7)	14,6 (9,7-23,4)	16,3 (12,7-30,3)	0,04	0,014	0,25

Tab. 22. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie kontrolnej (K) i w podgrupach pacjentów z AIH, HBV i HCV

Tabl. 22. Laboratory parameters in the control group and AIH, HBV and HCV patients

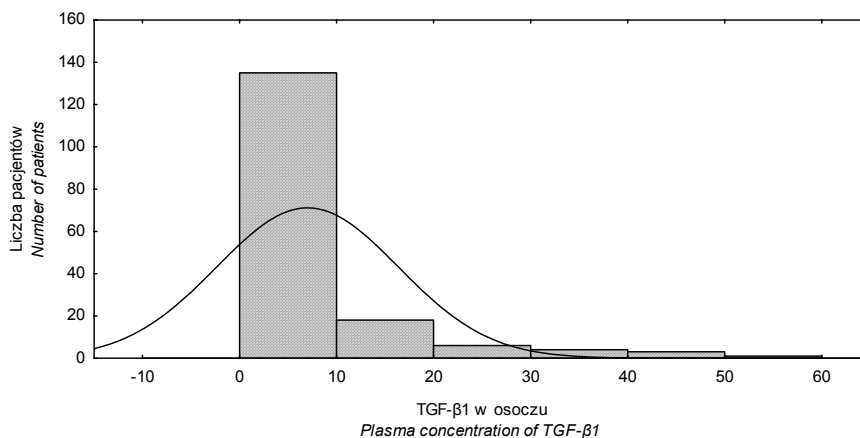
	Kontrola / Control Mediana / Median zakres / range	AIH Mediana / Median zakres / range	HBV Mediana / Median zakres / range	HCV Mediana / Median zakres / range	P (K vs. AIH)	P (K vs. HBV)	P (K vs. HCV)	P (AIH vs. HBV)	P (AIH vs. HCV)	P (HBV vs. HCV)
N	42	7	10	4						
WBC (G/l)	7,1 (3,8-12,8)	7,89 (3,3-27,96)	6,71 (4,3-13,8)	7,98 (5,4-13,8)	0,9	0,2	0,55	0,56	0,83	0,25
Fe (ug/dl)	88 (38-201)	56 (3-220)	87 (36-124)	77 (36-87)	0,38	0,26	0,22	0,05	0,59	0,14
Neutro (%)	53 (26-75)	62 (30-89)	55 (35,8-74)	42,5 (36-56)	0,58	0,6	0,18	0,72	0,14	0,1
Eoz (%)	3 (0-8,3)	2,3 (0-12,1)	2,5 (0-9)	6 (2,8-7)	0,77	0,6	0,44	0,37	0,29	0,08
Limf (%)	38,5 (15-61)	28,9 (2,5-58,4)	34 (18-53)	46,5 (29-54)	0,88	0,41	0,35	0,81	0,33	0,22
Mono (%)	5 (1-8)	5 (2-11)	5 (3-13)	5,5 (4,1-13)	0,69	0,41	0,27	0,68	0,39	0,59
HGB (g/dl)	13,5 (10,5-16,2)	12,8 (7,8-16,5)	13,4 (10,9-16,2)	13 (12,1-13,8)	0,1	0,16	0,35	0,05	0,59	0,10
Hct (%)	39,2 (34-46,6)	37,8 (26-47,6)	38,5 (32,2-48,6)	37,5 (35,7-39,1)	0,14	0,30	0,25	0,1	0,83	0,05
PLT (G/ul)	293 (145-536)	352 (125-732)	254 (128-348)	216 (128-327)	0,82	0,27	0,09	0,29	0,13	0,21
CRP (mg/l)	1,6 (0,2-8,5)	35 (0,1-212)	2,5 (0,6-35)	3,8 (0,8-5,7)	0,09	0,64	0,22	0,24	0,83	0,12
OB. (mm/h) ESR (mm/h)	6 (6-12)	12 (1-105)	8 (4-82)	8 (6-12)	0,13	0,33	0,21	0,47	0,83	0,78
ALT (U/l)	14 (6-31)	14 (4-217)	70 (14-963)	78 (67-118)	<0,001	<0,001	0,001	0,08	0,39	0,35
AST (U/l)	23 (6-42)	20 (11-200)	79 (19-808)	60 (40-95)	0,004	0,02	0,01	0,12	0,09	0,76
GGTP (U/l)	12 (8-23)	15 (6-640)	34 (9-372)	34 (13-49)	0,002	0,09	0,02	0,03	0,24	0,49

	Kontrola / Control Mediana / Median zakres / range	AIH Mediana / Median zakres / range	HBV Mediana / Median zakres / range	HCV Mediana / Median zakres / range	P (K vs. AIH)	P (K vs. HBV)	P (K vs. HCV)	P (AIH vs. HBV)	P (AIH vs. HCV)	P (HBV vs. HCV)
N	42	7	10	4						
Białko całkowite <i>T. protein</i> (g/l)	75 (61-83)	81,5 (74-87)	76 (72-82)	74 (72-79)	0,04	0,35	0,65	0,1	0,13	0,32
Albumina <i>Albumin</i> (g/dl)	43, (34-59)	40 (31-58)	40 (38-46)	40,5 (39-45)	0,66	0,44	0,65	0,14	0,64	0,49
IgA (g/l)	1,3 (0,36-3,9)	1,2 (0,6-2,45)	1,35 (68-2,45)	1,2 (12-1,27)	0,58	0,69	0,62	0,57	0,09	0,26
IgG (g/l)	10,7 (6,2-13,3)	14,84 (9,26-50,9)	13,72 (12,2-18,4)	14,74 (13,5-15,8)	0,03	0,06	0,01	0,12	0,14	0,5
IgM (g/l)	0,8 (0,7-1,26)	10 (1-1,97)	1,4 (0,91-2,13)	1,6 (0,98-2,2)	0,09	0,02	0,04	0,22	0,39	0,92
γ -glob (%)	12,8 (8,9-14,7)	15,90 (9,7-37,7)	15,35 (12,4-37,7)	13,8 (13,5-14,8)	0,03	0,04	0,09	0,2	0,11	0,23

4.2. Stężenie transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1 w osoczu

4.2.1. Stężenie TGF- β 1 w osoczu w badanych grupach dzieci

Ocenę stężenia TGF- β 1 w osoczu przeprowadzono u 167 badanych. Wartości wahały się od 0,11 do 55,10 ng/ml (średnio $7,01 \pm 9,37$ ng/ml; mediana 3,51 ng/ml), rozkład wartości stężeń różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p < 0,001$) (ryc. 12).

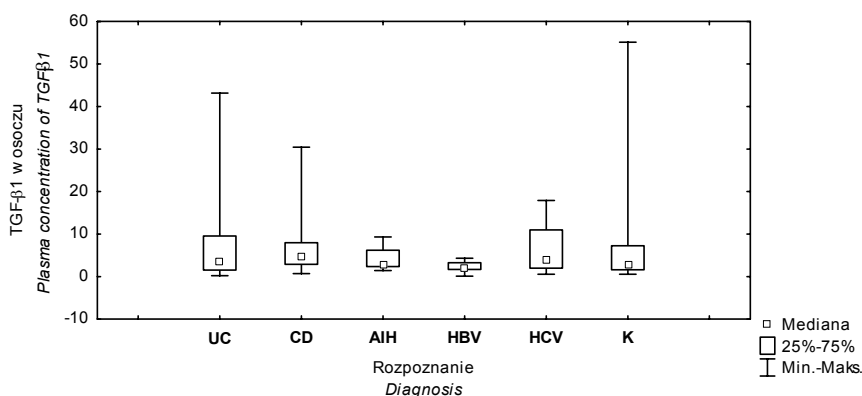


Ryc. 12. Rozkład stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu w badanej grupie dzieci
 Fig. 12. Histogram of plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in the study group

Porównanie średnich wartości stężenia TGF- β 1 w osoczu pomiędzy wszystkimi grupami badanych (K vs. NZJ vs. PZW) nie wykazało statystycznie istotnej różnicy, chociaż poziom istotności był na granicy znamienności ($p=0,06$). Nie obserwowano także statystycznie istotnej różnicy stężenia TGF- β 1 w osoczu między wszystkimi badanymi podgrupami chorych (UC, CD, AIH, HBV, HCV) i grupą kontrolną ($p=0,13$) ani gdy analizę przeprowadzono oddzielnie dla grupy NZJ (UC i CD) ($p=0,16$) czy dla grupy PZW (AIH, HCV, HBV) ($p=0,59$). Szczegółowe dane przedstawia tabela 23 i rycina 13.

Tab. 23. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu w poszczególnych grupach i podgrupach badanych
 Tabl. 23. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in the study groups and subgroups

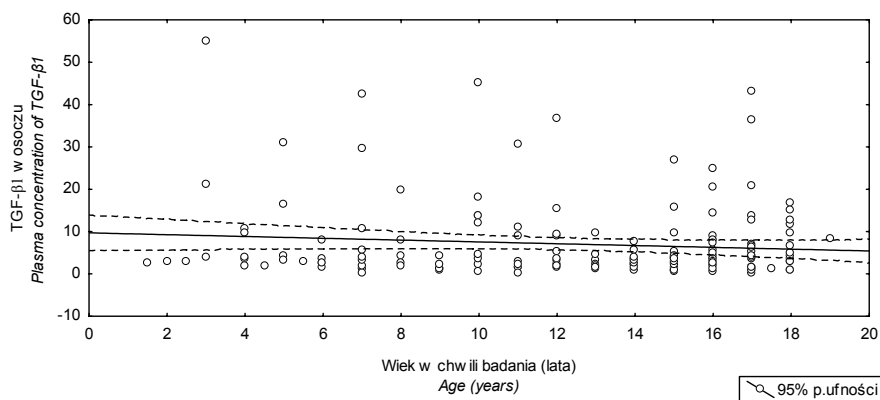
Grupa Group	N	Średnie Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
K / Control	42	6,96	2,79	0,54	55,10	11,61
NZJ / IBD	104	7,71	3,72	0,20	43,14	9,05
UC	68	7,86	3,54	0,20	43,14	9,83
CD	36	7,46	4,43	0,72	30,45	7,49
PZW / Ch.h.	21	3,63	2,74	0,11	17,91	3,87
AIH	7	3,99	2,74	1,43	9,34	2,79
HBV	10	2,22	2,08	0,11	4,30	1,40
HCV	4	6,49	3,75	0,55	17,91	7,76



Ryc. 13. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu w poszczególnych podgrupach badanych
 Fig. 13. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in the study subgroups

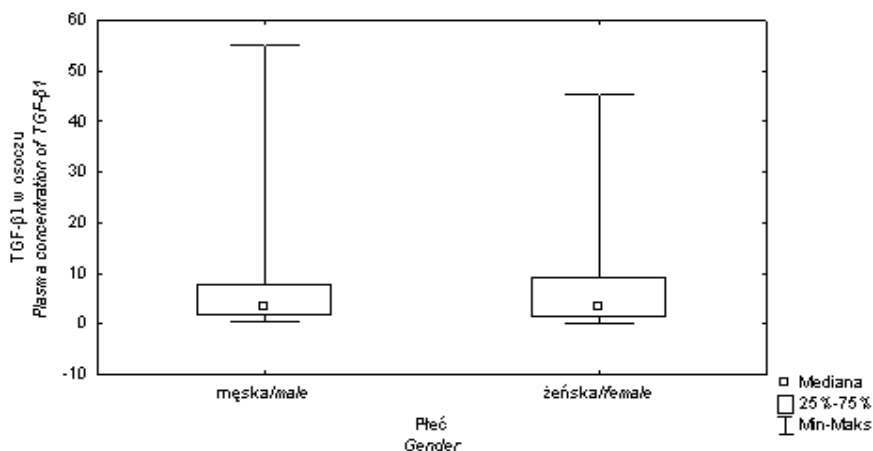
4.2.2. Stężenie TGF- β 1 w osoczu a wiek i płeć badanych

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy wartości stężenia TGF- β 1 w osoczu w zależności od wieku w całej badanej grupie dzieci (K, NZJ, PZW) ($R_s = -0,01$; $p = 0,89$) (ryc. 14).



Ryc. 14. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od wieku badanych
 Fig. 14. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the children's age in the study group

Nie wykazano również statystycznie istotnej zależności stężenia TGF- β 1 w osoczu od płci dla całej badanej grupy (K, NZJ, PZW – $p = 0,84$) (ryc. 15).

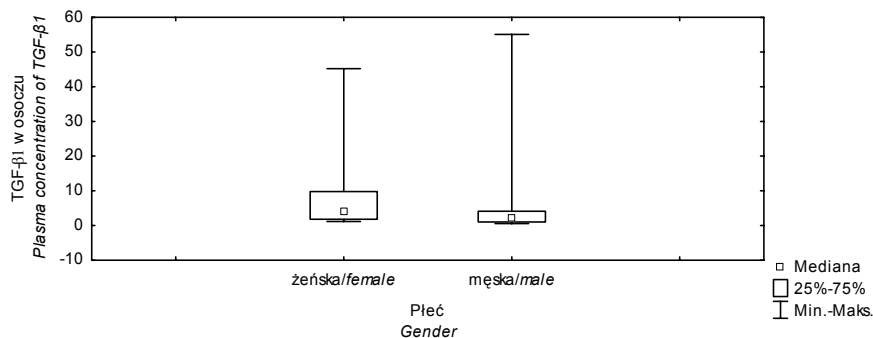


Ryc. 15. Zależność stężenia TGF-β1 (ng/ml) w osoczu od płci badanych

Fig. 15. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the children's gender in the study group

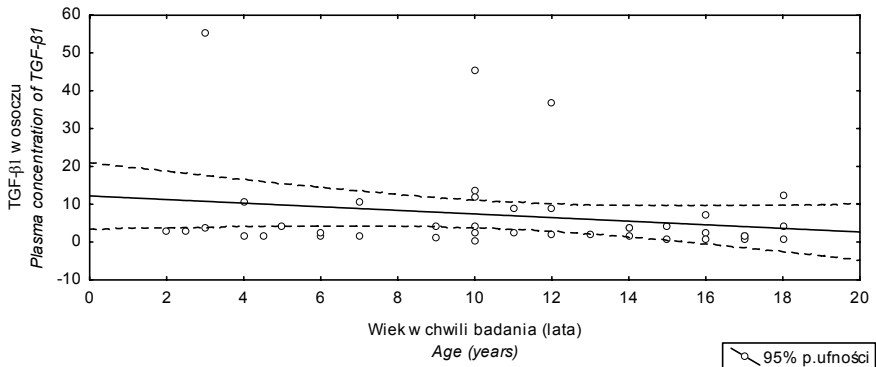
4.2.3. Stężenie TGF-β1 w osoczu a wiek i płeć w grupie kontrolnej

Nie stwierdzono również statystycznie istotnej korelacji wartości stężenia TGF-β1 w osoczu z płcią i wiekiem w grupie kontrolnej ($RS = -0,26$; $p = 0,09$) (ryc. 16 i 17).



Ryc. 16. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu w zależności od płci w grupie kontrolnej

Fig. 16. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the children's gender in the control group



Ryc. 17. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu w zależności od wieku w grupie kontrolnej
 Fig. 17. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the children's age in the control group

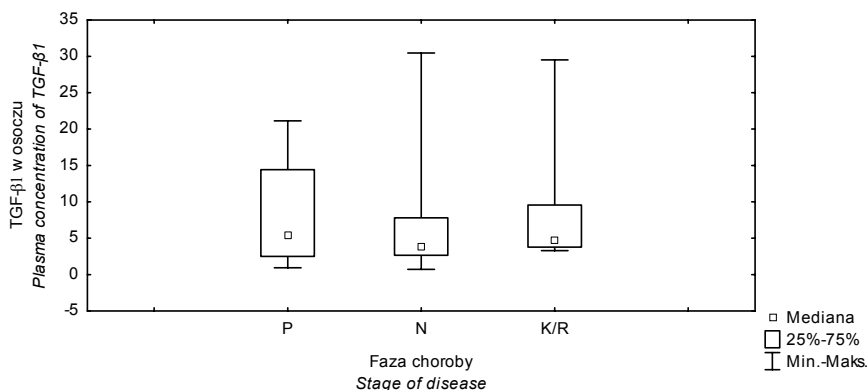
4.2.4. Stężenie TGF-β1 w osoczu a faza choroby w grupie pacjentów z NZJ

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy stężenia TGF-β1 w osoczu w zależności od fazy choroby, w której wykonywano oznaczenie (początek, nawrót czy remisja choroby) w całej grupie pacjentów z NZJ i w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,22$) oraz w podgrupach chorych – UC ($p=0,55$) i CD ($p=0,66$). Ilustrują to tabela 24 i ryciny 18 oraz 19.

Tab. 24. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu w zależności od fazy choroby w grupie NZJ oraz w grupie kontrolnej

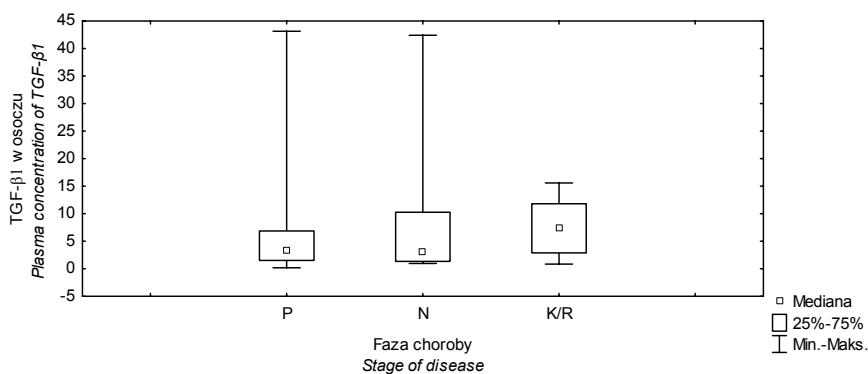
Tabl. 24. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the stage of disease in IBD group

Faza choroby Stage of disease	N	Średnie Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
P (początek – NZJ) Presentation – IBD	43	8,59	3,47	0,20	45,22	11,39
N (nawrót – NZJ) Relapse – IBD	43	7,22	3,53	0,72	42,42	8,81
K/R (remisja – NZJ) Remission – IBD	18	7,91	5,21	0,86	29,51	6,87
K (gr. kontrolna) Control group	42	6,30	2,94	0,64	55,10	10,22



Ryc. 18. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od fazy choroby w podgrupie CD

Fig. 18. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the stage of disease in CD group

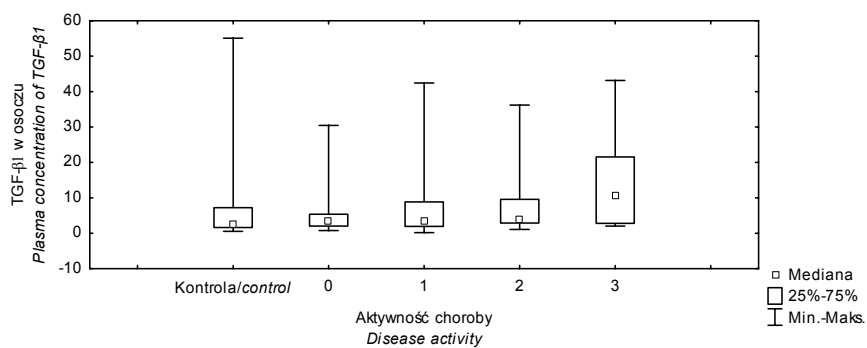


Ryc. 19. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od fazy choroby w podgrupie UC

Fig. 19. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the stage of disease in UC group

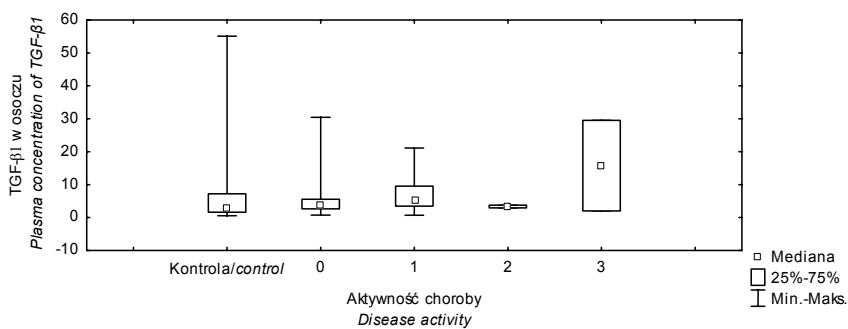
4.2.5. Stężenie TGF- β 1 w osoczu pacjentów z NZJ w różnych stopniach aktywności choroby oraz w porównaniu z grupą kontrolną

Dla całej grupy dzieci z NZJ nie obserwowano różnic znamiennej statystycznie pomiędzy stężeniem TGF- β 1 w osoczu u pacjentów w poszczególnych stopniach aktywności choroby ($p=0,43$) oraz w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,27$). Podobne wyniki otrzymano dla chorych z UC (odpowiednio $p=0,13$ i $p=0,14$) i z CD (odpowiednio $p=0,44$ i $p=0,23$). Ilustrują to ryciny: 20, 21 oraz 22.



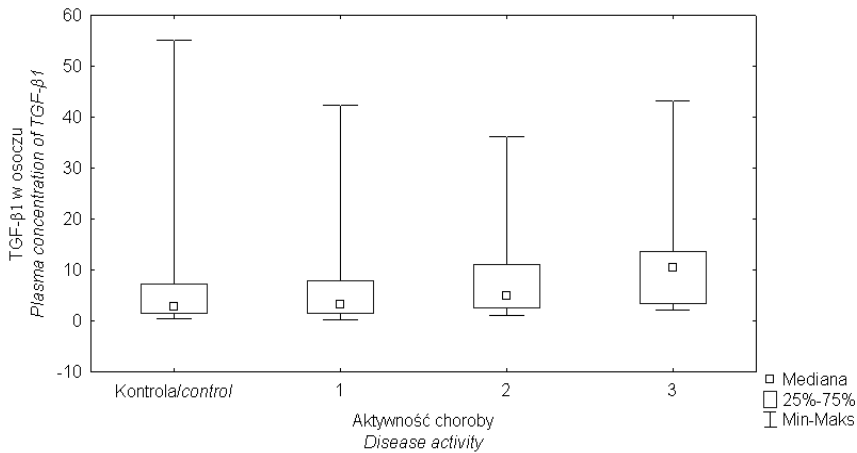
Ryc. 20. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od stopnia aktywności choroby w grupie pacjentów z NZJ w porównaniu z grupą kontrolną

Fig. 20. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the disease activity in IBD group and in the control group



Ryc. 21. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od stopnia aktywności choroby w grupie pacjentów z CD w porównaniu z grupą kontrolną

Fig. 21. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the disease activity in CD group and in the control group

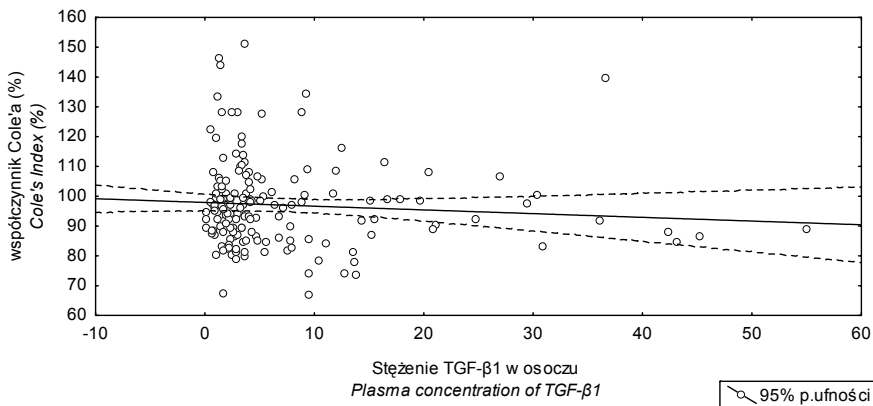


Ryc. 22. Zależność stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu od stopnia aktywności choroby w grupie pacjentów z UC w porównaniu z grupą kontrolną

Fig. 22. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the disease activity in UC group and in the control group

4.2.6. Stężenie TGF- β 1 w osoczu a stan odżywienia w grupie pacjentów z NZJ

Dla całej grupy pacjentów z NZJ nie obserwowano statystycznie istotnych różnic stężenia TGF- β 1 w osoczu w zależności od współczynnika Cole'a ($p=0,18$) (ryc. 27). Podobne wyniki uzyskano w podgrupach pacjentów z CD ($p=0,3$) i u chorych z UC ($p=0,17$) (ryc. 23).



Ryc. 23. Zależność między stężeniem TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu a wartością współczynnika Cole'a (%) w grupie pacjentów z NZJ

Fig. 23. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the Cole's Index (%) in IBD group

4.2.7. Stężenie TGF-β1 w osoczu a wyniki badań biochemicznych w analizowanych grupach

W analizie grup wykazano:

W grupie kontrolnej (K):

- jedyną statystycznie istotną korelację obserwowano pomiędzy aktywnością GGTP i stężeniem TGF-β1 w osoczu ($R_s=0,72$; $p=0,02$).

W grupie NZJ:

- nie obserwowano żadnych statystycznie istotnych korelacji.

W grupie PZW:

- jedyne statystycznie istotne korelacje obserwowano pomiędzy odsetkiem leukocytów kwasochłonnych a stężeniem TGF-β1 w osoczu ($R_s=0,489$; $p=0,04$) oraz aktywnością GGTP i stężeniem TGF-β1 w osoczu ($R_s=0,513$; $p=0,02$).

Następnie podobną analizę przeprowadzono dla badanych podgrup chorych:

dla podgrupy UC:

- jedyną statystycznie istotną korelację obserwowano pomiędzy odsetkiem leukocytów kwasochłonnych i stężeniem TGF-β1 w osoczu ($R_s=-0,254$; $p=0,04$),

dla podgrupy CD:

- jedyną statystycznie istotną zależność obserwowano dla korelacji odsetka γ -globulin i stężenia TGF-β1 w osoczu ($R_s=-0,598$; $p=0,02$),

dla podgrupy AIH:

- nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji,

dla podgrupy HBV:

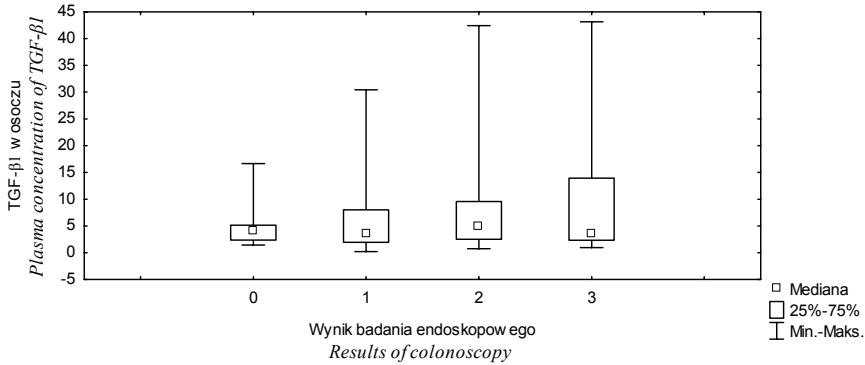
- nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji,

dla podgrupy HCV:

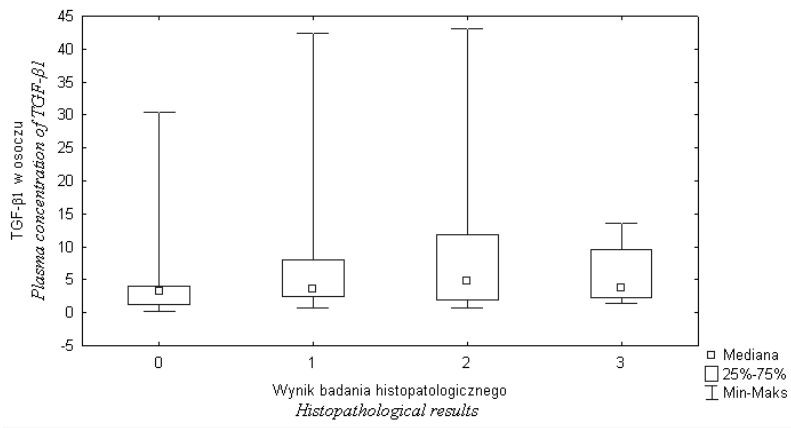
- nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji.

4.2.8. Stężenie TGF-β1 w osoczu a wyniki badania endoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z NZJ

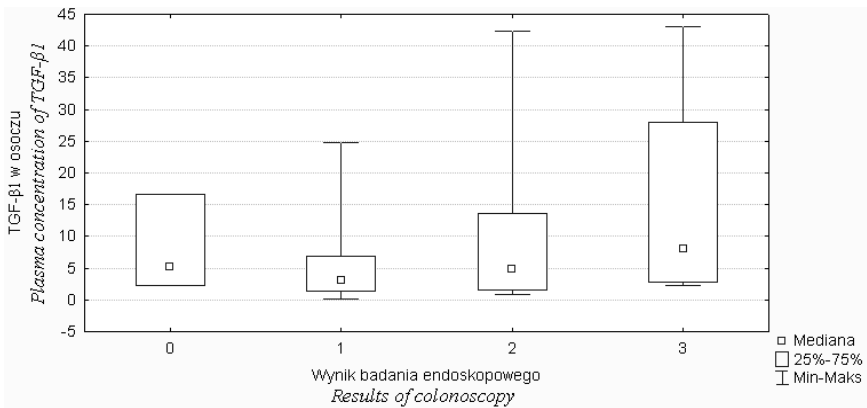
W całej grupie pacjentów z NZJ nie obserwowano statystycznie istotnej zależności między poziomem TGF-β1 w osoczu a oceną kolonoskopową ($p=0,42$) oraz wynikiem badania histopatologicznego ($p=0,59$) (ryc. 24 i 25). Powyższych zależności nie znaleziono także w badanych podgrupach pacjentów z NZJ: UC (kolonoskopia – $p=0,32$, badanie histopatologiczne – $p=0,23$) (ryc. 26, 27) i CD (kolonoskopia – $p=0,41$, badanie histopatologiczne – $p=0,95$) (ryc. 28, 29).



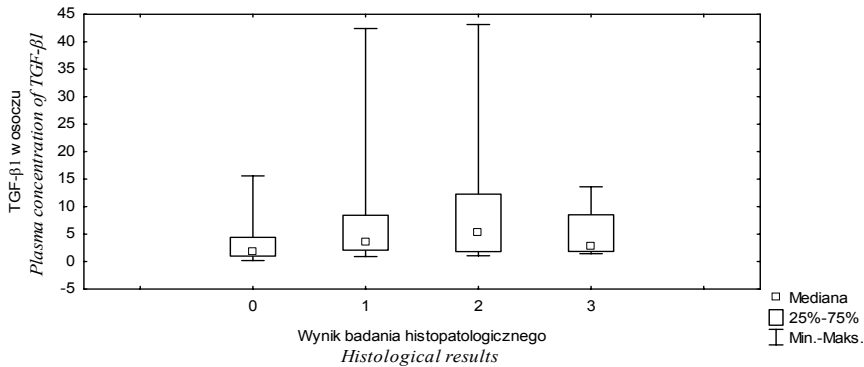
Ryc. 24. Stężenie TGF- β 1 w osoczu (ng/ml) a wyniki badania endoskopowego u pacjentów z NZJ
 Fig. 24. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the results of colonoscopy in IBD group



Ryc. 25. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu a wyniki badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z NZJ
 Fig. 25. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the histopathological results in IBD group

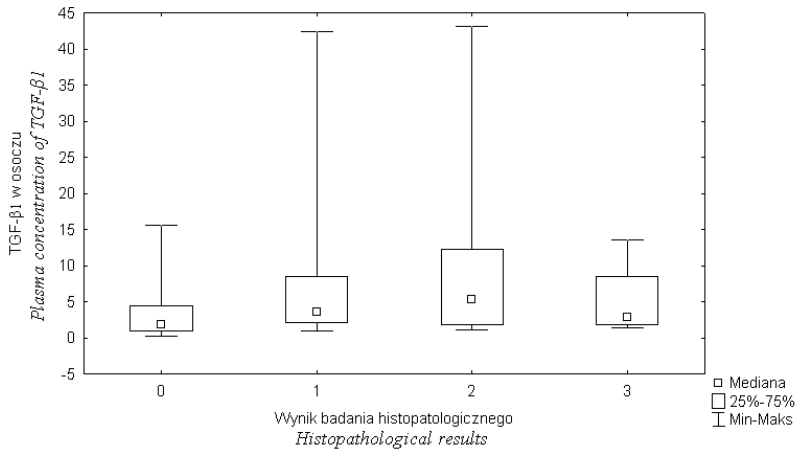


Ryc. 26 Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu a wyniki badania endoskopowego u pacjentów z UC
 Fig. 26. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to the results of colonoscopy in UC group



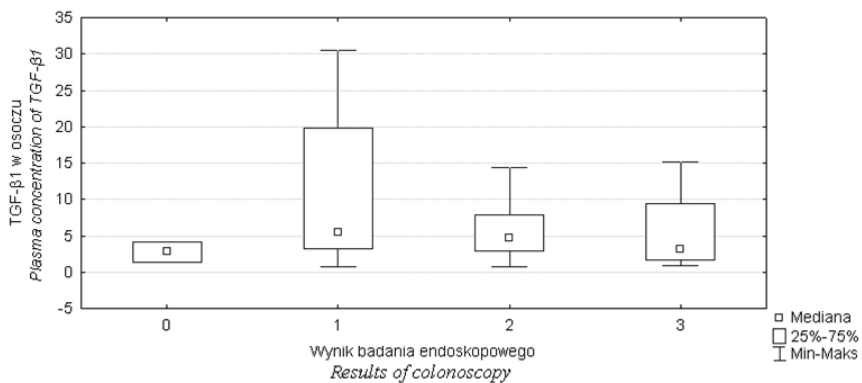
Ryc. 27. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a wyniki badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z UC

Fig. 27. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the histopathological results in UC group



Ryc. 28. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a wyniki badania endoskopowego u pacjentów z CD

Fig. 28. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the results of colonoscopy in CD group



Ryc. 29 Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a wyniki badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelita u pacjentów z CD

Fig. 29. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to the histopathological results in CD group

4.2.9. Analiza stężenia TGF- β 1 w osoczu u pacjentów z NZJ, u których wykonano badanie dwukrotnie

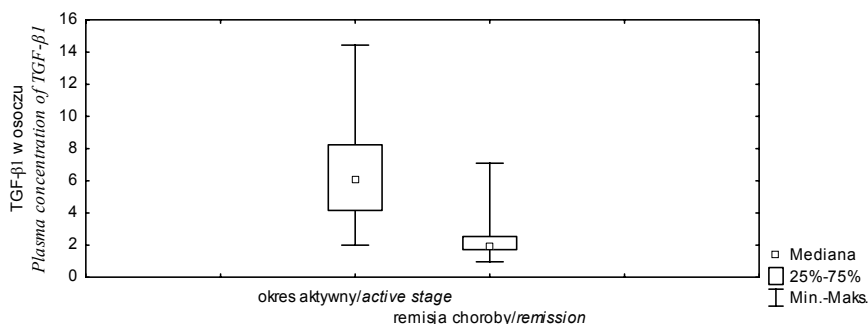
4.2.9.1. Stężenie TGF- β 1 w aktywnym okresie choroby i w remisji oraz w grupie kontrolnej

Do analizy wykorzystano dane dotyczące grupy kontrolnej oraz 10 pacjentów z NZJ, u których dokonano dwukrotnego pomiaru stężenia TGF- β 1 w osoczu: 1) w aktywnym okresie choroby i 2) w okresie remisji. Wykazano różnicę istotną statystycznie stężenia TGF- β 1 w osoczu mierzonego w okresie aktywnym choroby w porównaniu z wynikami, które uzyskano u tych samych pacjentów w czasie remisji ($p=0,005$), wartości wyższe obserwowano w aktywnym okresie choroby (tab. 25, ryc. 30, 31).

Tab. 25. Stężenie TGF- β 1 w osoczu (ng/ml) w grupie kontrolnej oraz badane dwukrotnie u tych samych chorych z NZJ w okresie aktywnym choroby i w remisji

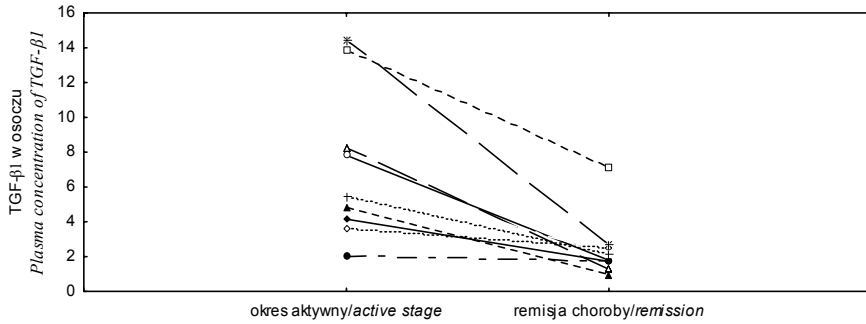
Tabl. 25. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in the control group and measured twice in IBD patients during active stage of disease and in the remission

Grupa Group	N	Średnie Mean	Mediana Median	Min.	Max.	SD
Kontrolna / Control	42	6,96	2,79	0,54	55,10	11,60
Aktywny okres choroby Active stage	10	7,10	6,03	2,00	14,44	4,16
Remisja / Remission	10	2,41	1,94	0,96	7,09	1,73



Ryc. 30. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu mierzone w okresie aktywnym choroby i w okresie remisji u chorych z NZJ (analiza zbiorcza)

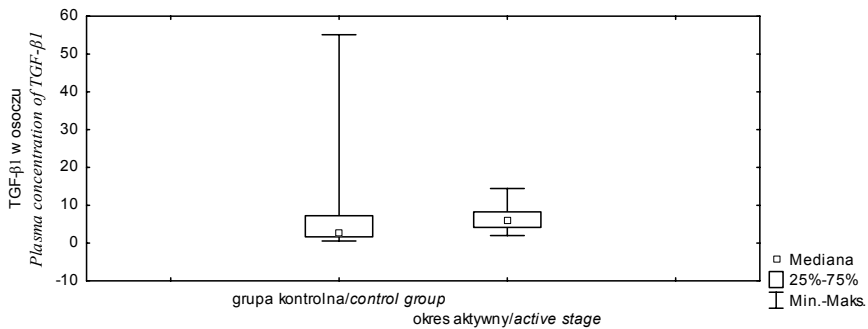
Fig. 30. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in IBD patients during active stage of disease and in the remission (collective data)



Ryc. 31. Porównanie stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu w okresie aktywnym i w remisji u chorych z NZJ (analiza indywidualna)

Fig. 31. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in IBD patients during active stage of disease and in the remission (individual data)

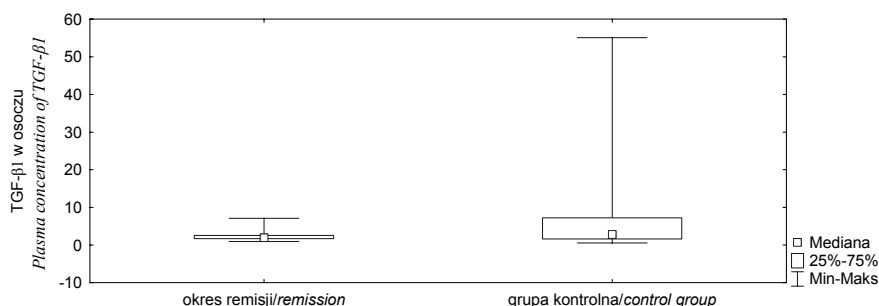
Poziom TGF- β 1 w osoczu mierzony u pacjentów w aktywnym okresie choroby (grupa chorych, u których wykonano podwójne pomiary poziomu TGF- β 1 w osoczu: n=10) był także znacząco statystycznie wyższy w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej (p=0,03) (tab. 25, ryc. 32).



Ryc. 32. Stężenie TGF- β 1 w osoczu (ng/ml) w grupie kontrolnej i okresie aktywnym choroby u pacjentów z NZJ

Fig. 32. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in the control group and in IBD patients during active stage of disease

Natomiast nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy stężenia TGF- β 1 w osoczu pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych z NZJ (n=10), u których oznaczenie wykonywano w okresie remisji choroby (p=0,26) (tab. 25, ryc. 33).



Ryc. 33. Stężenie TGF-β1 w osoczu (ng/ml) w grupie kontrolnej i okresie remisji u pacjentów z NZJ
 Fig. 33. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in the control group and in IBD patients in the remission

4.3. Poziom mRNA genu kodującego TGF-β1 badany w bioptatach błony śluzowej jelita i wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

W celu oznaczenia względnej ilości mRNA genu kodującego TGF-β1, uzyskany wynik porównywano z analogiczną reakcją dla transkryptu β-aktyny. Ostatecznie obliczenia poziomu ekspresji genu *TGF-β1* dokonano w stosunku do mRNA β-aktyny (bact) wg następującego wzoru:

$$\text{TGF-}\beta / \text{bact} (\%) = 2^{-\Delta\text{Ct}} \times 100\%, \text{ gdzie } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{TGF-}\beta} - \text{Ct}_{\text{bact}}.$$

Umożliwiło to ocenę względnego poziomu mRNA genu kodującego TGF-β1 w stosunku do zawartości mRNA genu β-aktyny, ulegającego ekspresji na stałym poziomie (genu konstytutywnie ekspresjonowanego).

Celem uproszczenia, w dalszych etapach pracy dla oznaczenia wyników powyższych badań zastosowano określenie – **poziom mRNA genu *TGF-β1***.

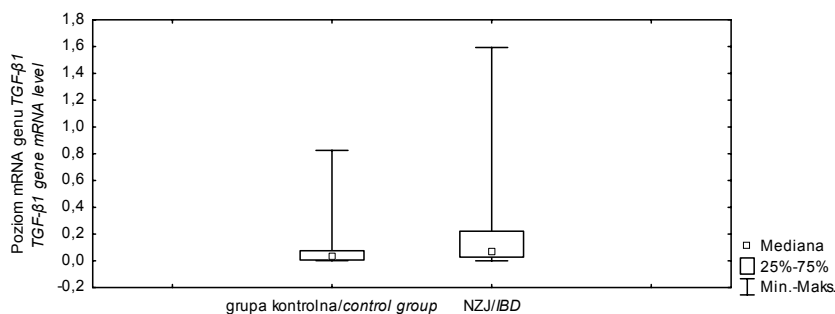
4.3.1. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby u chorych z NZJ i PZW

Znamiennie wyższy poziom mRNA genu *TGF-β1* obserwowano u chorych z NZJ (ocenionym w wycinku błony śluzowej jelita makroskopowo zmienionego chorobowo) w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,002$), natomiast nie wykazano istotnej różnicy między grupą kontrolną a pacjentami z PZW ($p=0,41$) oraz gdy porównywano chorych z NZJ (wycinek błony śluzowej jelita makroskopowo zmienionego) i PZW ($p=0,78$) (tab. 26, ryc. 34).

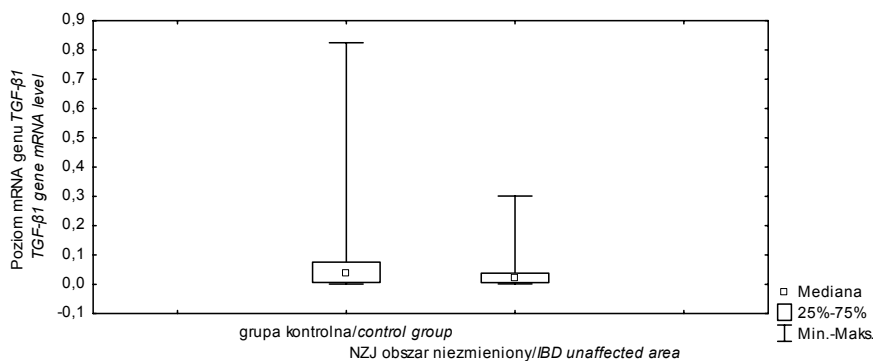
Poziom mRNA genu *TGF-β1* stwierdzony u chorych z NZJ w aktywnym okresie choroby, ale w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo niezmiennych, nie różnił się istotnie od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej ($p=0,12$) (tab. 26, ryc. 35).

Tab. 26. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i w poszczególnych grupach badanych
 Tabl. 26. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in the study groups

Poziom mRNA genu <i>TGF-β1</i> <i>TGF-β1</i> gene mRNA level	N	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>	Min.	Max	SD
Kontrola / <i>Control</i>	42	0,08596	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
NZJ – błona śluzowa jelita makroskopowo zmienionego chorobowo <i>IBD – specimen from affected area</i>	90	0,15040	0,06569	0,00068	1,59320	0,21443
NZJ – błona śluzowa jelita makroskopowo niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby. <i>IBD – specimen from unaffected area</i>	41	0,03852	0,02244	0,00108	0,30119	0,06087
PZW / <i>Ch.h.</i>	14	0,11371	0,04281	0,00114	0,52556	0,15573



Ryc. 34. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i u pacjentów z NZJ (jelito makroskopowo zmienione) w aktywnym okresie choroby
 Fig. 34. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in IBD patients (specimen from the affected area) during active stage of disease



Ryc. 35. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i u pacjentów z NZJ (jelito makroskopowo niezmienione) w aktywnym okresie choroby
 Fig. 35. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in IBD patients (specimen from the unaffected area) during active stage of disease

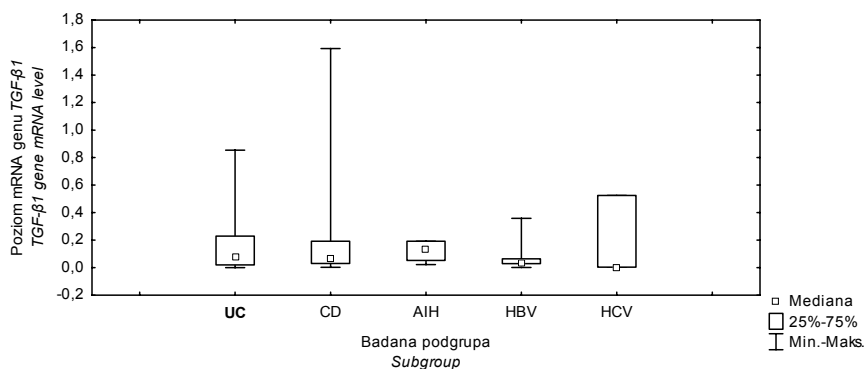
4.3.2. Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w bioptatach błony śluzowej jelita (jelito makroskopowo zmienione chorobowo) i wątroby w badanych podgrupach chorych z NZJ i PZW

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 pomiędzy podgrupami chorych (UC i CD: $p=0,91$, AIH, HBV i HCV: $p=0,6$) (tab. 27, ryc. 36).

Tab. 27. Poziom mRNA genu *TGF- β 1* w poszczególnych grupach i podgrupach chorych

Tabl. 27. *TGF- β 1* gene mRNA level in the study groups and subgroups

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
NZJ / IBD	90	0,15611	0,06805	0,00068	1,59320	0,22232
UC	57	0,15512	0,07289	0,00068	0,85378	0,18372
CD	33	0,15782	0,06569	0,00296	1,59320	0,27999
PZW / Ch.h	14	0,11371	0,04281	0,00114	0,52556	0,15573
AIH	4	0,12272	0,13813	0,02224	0,19237	0,08427
HBV	7	0,08097	0,03173	0,00114	0,35897	0,12423
HCV	3	0,17807	0,00488	0,00377	0,52556	0,30094
Razem / Total	104					



Ryc.36. Poziom mRNA genu *TGF- β 1* w poszczególnych podgrupach chorych

Fig. 36. *TGF- β 1* gene mRNA level in the study groups and subgroups

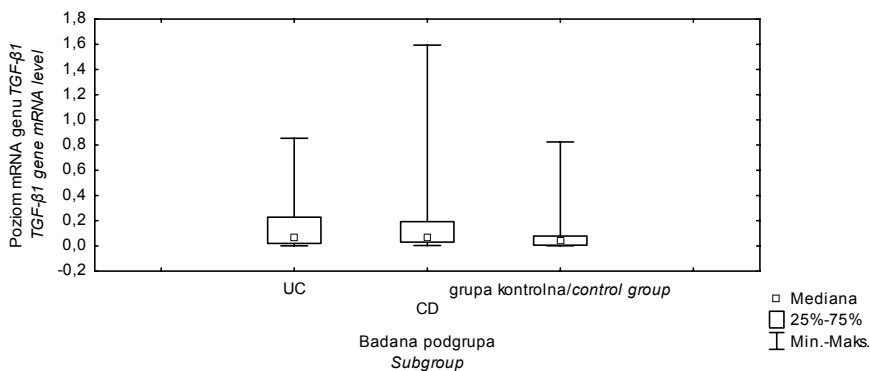
4.3.3. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u chorych z NZJ i PZW z uwzględnieniem szczegółowych rozpoznai (CD i UC oraz AIH, HBV, HCV) w porównaniu z grupą kontrolną

Podobnie jak dla całej grupy chorych z NZJ, także dla pacjentów z UC wykazano statystycznie istotną różnicę poziomu mRNA genu *TGF-β1* oznaczonego w tkance makroskopowo zmienionej chorobowo w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,02$) oraz na granicy znamienności pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami z CD ($p=0,05$). Poziomy wyższe stwierdzano w grupach dzieci chorych. Nie obserwowano natomiast statystycznie istotnej różnicy między wartościami uzyskanymi u chorych w podgrupach z CD i UC ($p=1,00$) (tab. 28, ryc. 37).

Tab. 28. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej oraz w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego chorobowo pacjentów z CD i UC w aktywnym okresie choroby

Tabl 28. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in CD and UC patients (specimen from the affected area) during active stage of disease

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min	Max	SD
Kontrola Control group	42	0,08592	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
CD	33	0,15782	0,06569	0,00292	1,59320	0,27999
UC	57	0,15512	0,07289	0,00068	0,85378	0,18372



Ryc. 37. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej oraz w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego chorobowo u pacjentów z CD i UC, w aktywnym okresie choroby

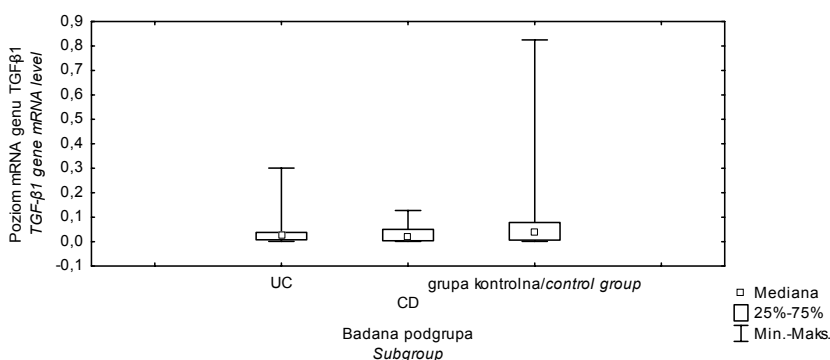
Fig. 37. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in CD and UC patients (specimen from the affected area) during active stage of disease

Natomiast gdy materiał tkankowy pochodził z błony śluzowej jelita makroskopowo niezmienionego w aktywnym okresie choroby, nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* między grupą kontrolną a podgrupami chorych z CD i UC ($p=0,26$) (tab. 29, ryc. 38).

Tab. 29. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej oraz w błonie śluzowej jelita makroskopowo niezmienionego w aktywnym okresie choroby u pacjentów z CD i UC

Tabl. 29. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in CD and UC patients (specimen from the unaffected area) during active stage of disease

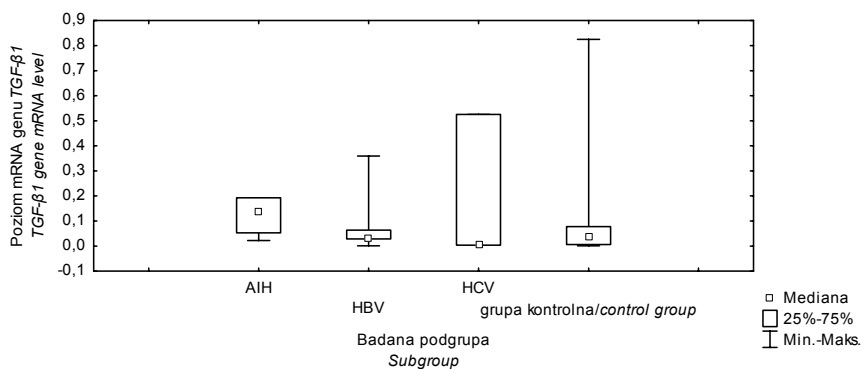
Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
Kontrola Control group	42	0,08591	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
CD	15	0,03107	0,02244	0,00114	0,12700	0,03536
UC	34	0,04588	0,02503	0,00108	0,30118	0,07388



Ryc. 38. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej oraz w błonie śluzowej jelita makroskopowo niezmienionego w aktywnym okresie choroby u pacjentów z CD i UC

Fig. 38. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in CD and UC patients (specimen from the unaffected area) during active stage of disease

Analizując wyniki uzyskane w podgrupach pacjentów z PZW nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między poziomem mRNA genu *TGF-β1* u tych chorych a grupą kontrolną ($p=0,45$) (ryc. 39).



Ryc. 39. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej oraz w podgrupach chorych z AIH, HBV, HCV

Fig. 39. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in AIH, HBV, and HCV patients

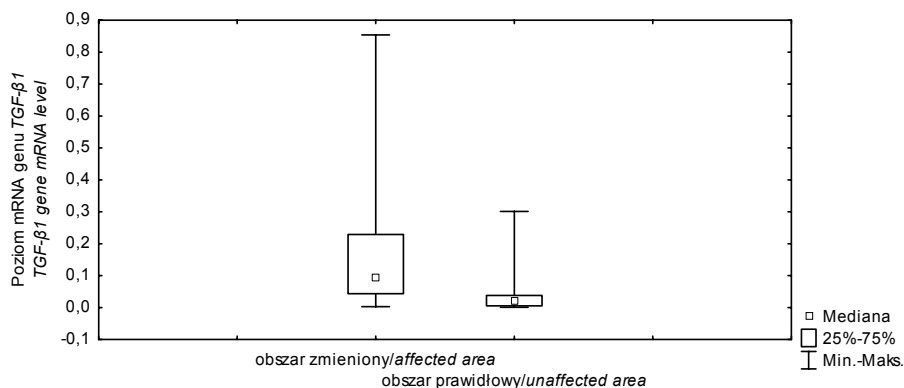
4.3.4. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych i niezmienionych chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z NZJ

W analizie uwzględniono 41 chorych z NZJ (28 pacjentów z UC oraz 13 pacjentów z CD), u których w aktywnym okresie choroby, jednocześnie podczas kolonoskopii pobrano materiał tkankowy do badania z obu ww. obszarów jelit. Wykazano istotną statystycznie różnicę poziomu mRNA genu *TGF-β1* między uzyskanymi wynikami zarówno dla całej grupy pacjentów z NZJ ($p < 0,001$), jak i w podgrupach chorych z CD ($p < 0,001$) oraz z UC ($p < 0,001$). Wyższy poziom mRNA genu *TGF-β1* wykazano w tkankach ocenionych w badaniu endoskopowym jako zmienione chorobowo. Powyższe dane ilustrują: tabela numer 30 oraz ryciny numer: 40 i 41 (NZJ) oraz 42, 43 (CD) i 44, 45 (UC).

Tab. 30. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelit makroskopowo zmienionych i niezmienionych chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z NZJ (CD i UC), u których wykonano równocześnie te dwa badania

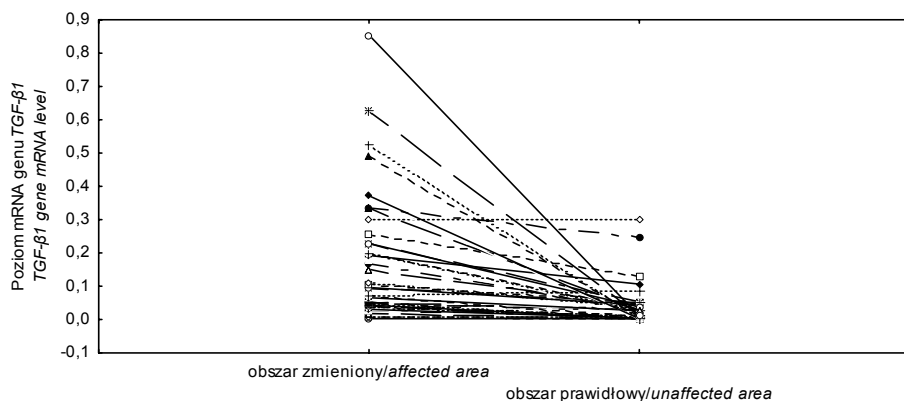
Tabl. 30. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in IBD group (in the same patients)

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min	Max	SD
NZJ – jelito makroskopowo zmienione chorobowo <i>IBD – specimen from affected area</i>	41	0,17453	0,09618	0,00271	0,85377	0,18828
CD	13	0,12974	0,07289	0,01822	0,37163	0,12327
UC	28	0,19532	0,13071	0,00271	0,85377	0,21059
NZJ – jelito makroskopowo niezmienione chorobowo <i>IBD – specimen from unaffected area</i>	41	0,03852	0,02244	0,00109	0,30118	0,06087
CD	13	0,02564	0,00766	0,00114	0,12699	0,03472
UC	28	0,04450	0,02762	0,00108	0,30118	0,06954



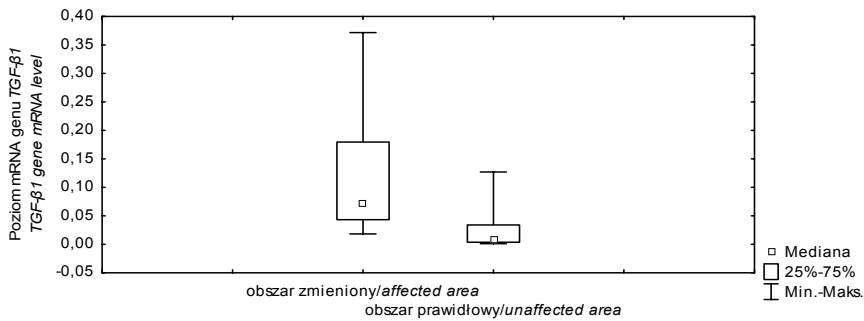
Ryc. 40. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelit makroskopowo zmienionych i niezmienionych chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z NZJ, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza zbiorcza)

Fig. 40. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in IBD group (collective data)



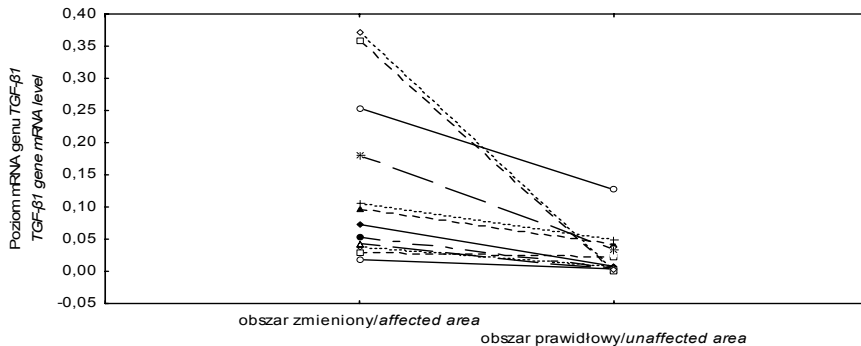
Ryc. 41. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego i niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z NZJ, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza indywidualna)

Fig. 41. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in IBD group in the same patients (individual data)



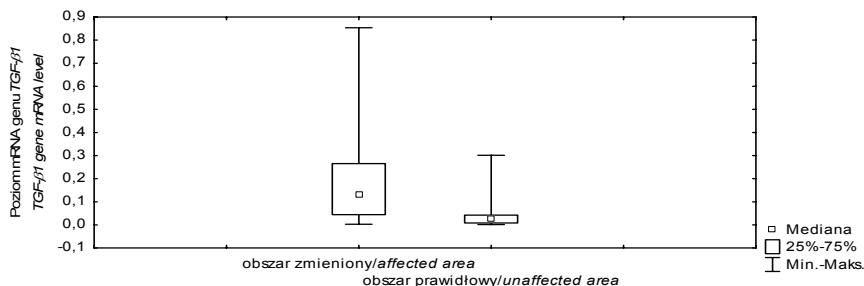
Ryc. 42. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego i niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z CD, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza zbiorcza)

Fig. 42. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in CD group in the same patients (collective data)



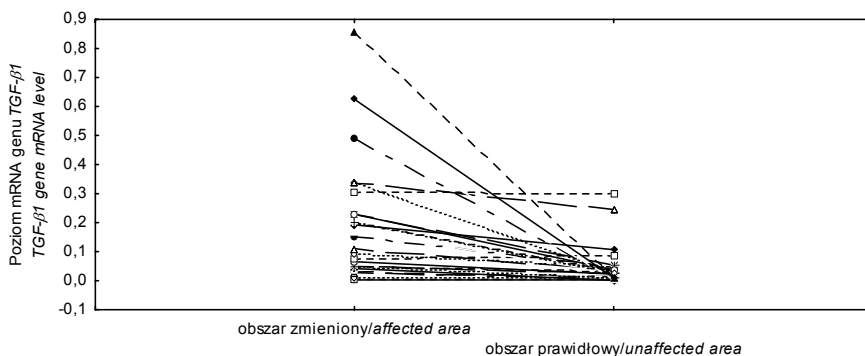
Ryc. 43. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego i niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z CD, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza indywidualna)

Fig. 43. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in CD group in the same patients (individual data)



Ryc. 44. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego i niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z UC, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza zbiorcza)

Fig. 44. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in UC group in the same patients (collective data)



Ryc. 45. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita makroskopowo zmienionego i niezmienionego chorobowo w aktywnym okresie choroby u pacjentów z UC, u których wykonano równocześnie te dwa badania (analiza indywidualna)

Fig. 45. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected and unaffected area during active stage of disease in UC group in the same patients (individual data)

4.3.5. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w poszczególnych fazach choroby u pacjentów z NZJ i w grupie kontrolnej

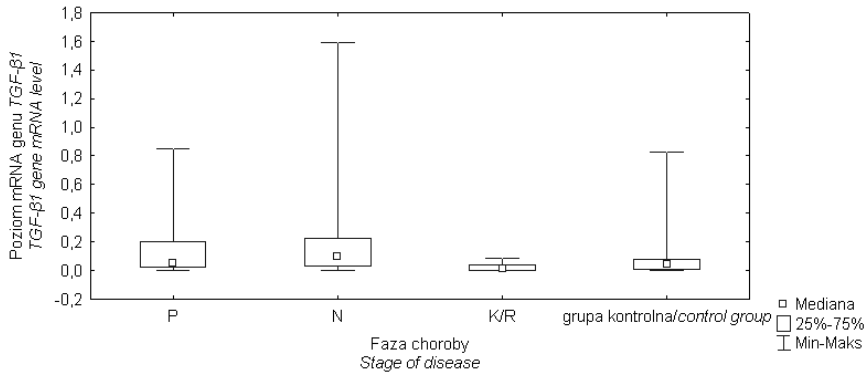
Jak poprzednio, dla pacjentów z NZJ zastosowano następujące oznaczenie poszczególnych faz choroby: początek choroby – P, nawrót choroby – N, remisja choroby – K/R oraz jako K oznaczono grupę kontrolną. Wykazano statystycznie wyższy poziom m-RNA genu *TGF-β1* w błonie śluzowej jelita w okresie nawrotu choroby w porównaniu z oznaczeniami wykonanymi w czasie remisji ($p=0,01$) oraz w grupie kontrolnej ($p=0,04$) (tab. 31, ryc. 46). Poniżej przedstawiono szczegółowe porównania:

- P vs N: $p=0,99$
- P vs K/R: $p=0,12$
- P vs K: $p=0,80$
- **N vs K/R: $p=0,01$**
- **N vs K: $p=0,04$**
- K/R vs K: $p=0,99$

Tab.31. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w zależności od fazy choroby u pacjentów z NZJ oraz w grupie kontrolnej

Tabl. 31. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the stage of disease in the control and IBD group

Faza choroby Stage of disease	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
P (początek – NZJ)/Presentation – IBD	40	0,14648	0,05363	0,00068	0,85377	0,19144
N (nawrót – NZJ)/Relapse – IBD	40	0,16643	0,09618	0,00271	1,59320	0,25152
K/R (remisja – NZJ)/Remission – IBD	10	0,02745	0,01390	0,00108	0,08373	0,03015
K (grupa kontrolna)/Control group	42	0,08591	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012

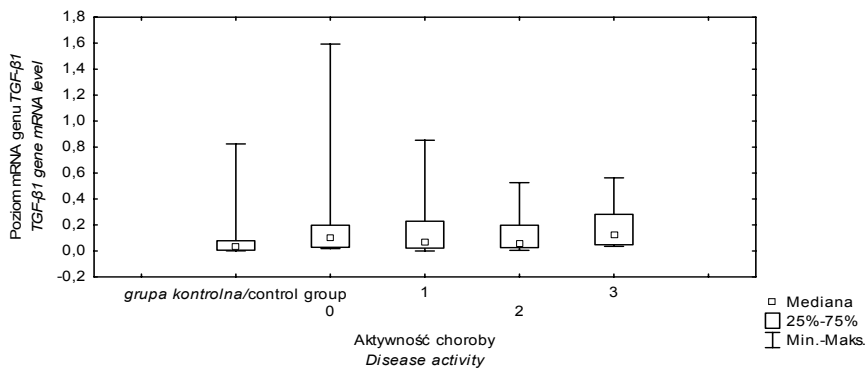


Ryc. 46. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w zależności od fazy choroby u pacjentów z NZJ oraz w grupie kontrolnej

Fig. 46. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the stage of disease in the control and IBD group

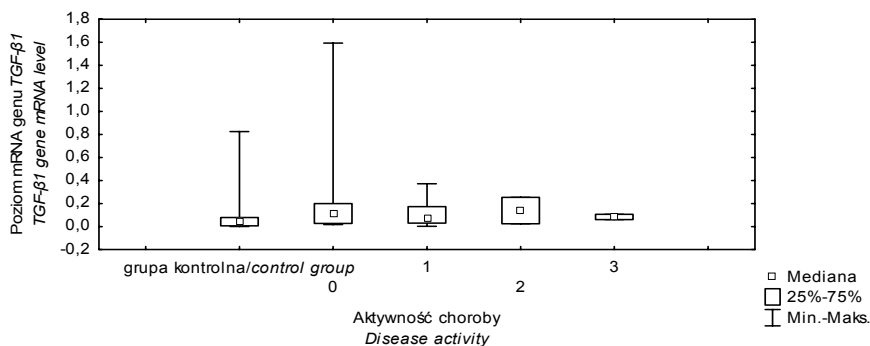
4.3.6. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a aktywność choroby u pacjentów z NZJ

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic poziomu mRNA genu *TGF-β1* w zależności od aktywności choroby dla całej grupy chorych z NZJ (jelito zmienione chorobowo) oraz w porównaniu z grupą kontrolną ($p > 0,05$) (ryc. 47). Podobnych zależności nie wykazano również w obrębie badanych podgrup chorych: CD ($p = 0,15$) (ryc. 48) i UC ($p = 0,13$) (ryc. 49).



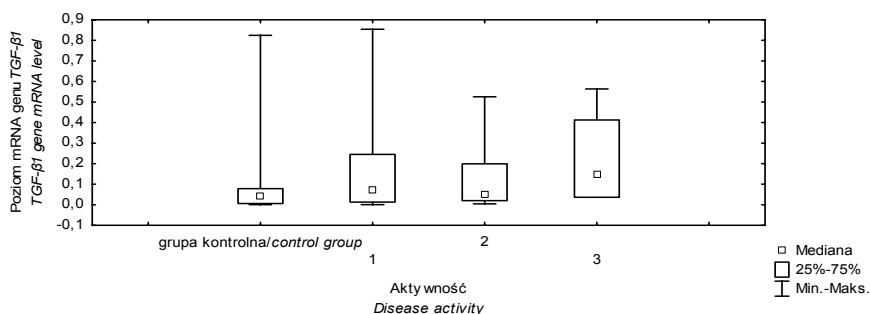
Ryc. 47. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z NZJ w zależności od aktywności choroby oraz w grupie kontrolnej

Fig. 47. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to disease activity in IBD group and in the control group



Ryc. 48. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z CD w zależności od aktywności choroby i w grupie kontrolnej

Fig. 48. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to disease activity in CD group and in the control group



Ryc. 49. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z UC w zależności od aktywności choroby i w grupie kontrolnej

Fig. 49. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to disease activity in UC group and in the control group

4.3.7. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a parametry laboratoryjne

4.3.7.1. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a badane parametry laboratoryjne w grupie chorych z NZJ

W wyniku przeprowadzonej analizy dla pacjentów z NZJ oraz z UC wykazano statystycznie istotną ujemną korelację między poziomem mRNA genu *TGF-β1* (oznaczenie wykonano w wycinku błony śluzowej jelita makroskopowo zmienionego chorobowo) a stężeniem żelaza w surowicy. Dla chorych z NZJ – $R_s = -0,21$; $p = 0,03$, dla UC – $R_s = -0,28$; $p = 0,04$ (tab. 32, 33 i 34).

Tab. 32. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (mRNA *TGF-β1*) a badane parametry laboratoryjne w całej grupy chorych z NZJ

Tabl. 32. *TGF-β1* gene mRNA level and laboratory parameters in IBD group

Parametry laboratoryjne <i>Laboratory parameters</i>	N	R	t(N-2)	poziom p <i>P-level</i>
WBC & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,152	1,422	0,16
Fe & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	-0,212	-2,152	0,03
Neutro & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,057	0,515	0,61
Eos & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,038	0,347	0,73
Limf & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	-0,107	-0,975	0,33
Mono & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,065	0,593	0,56
HGB & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,062	0,572	0,57
Hct & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,056	0,514	0,61
PLT & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,091	0,843	0,40
CRP & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,079	0,734	0,47
OB (<i>ESR</i>) & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,009	0,085	0,93
ALT & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,140	1,298	0,20
AST & mRNA <i>TGF-β1</i>	35	0,127	0,736	0,47
GGTP & mRNA <i>TGF-β1</i>	20	-0,086	-0,364	0,72
IgA & mRNA <i>TGF-β1</i>	19	0,148	0,618	0,54
IgG & mRNA <i>TGF-β1</i>	19	0,282	1,211	0,24
IgM & mRNA <i>TGF-β1</i>	18	-0,250	-1,032	0,32
γ-glob & mRNA <i>TGF-β1</i>	23	0,216	1,014	0,32
B. calk / <i>T. protein</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,124	1,119	0,27
Albumina / <i>Albumin</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	90	0,085	0,768	0,44

Tab. 33. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (mRNA *TGF-β1*) a badane parametry laboratoryjne dla chorych z UCTabl. 33. *TGF-β1* gene mRNA level (mRNA *TGF-β1*) and laboratory parameters in UC group

Parametry laboratoryjne <i>Laboratory parameters</i>	N	R	t(N-2)	poziom p <i>P-level</i>
WBC & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,162	1,195	0,24
Fe & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	-0,283	-2,149	0,04
Neutro & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,099	0,722	0,47
Eos & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	-0,090	-0,661	0,51
Limf & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	-0,126	-0,924	0,36
Mono & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	-0,026	-0,193	0,85
HGB & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,042	0,310	0,76
Hct & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,057	0,414	0,68
PLT & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,041	0,297	0,77
CRP & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,131	0,963	0,34
OB (<i>ESR</i>) & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	-0,019	-0,136	0,89
ALT & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,250	1,860	0,07
AST & mRNA <i>TGF-β1</i>	20	0,433	2,035	0,06
GGTP & mRNA <i>TGF-β1</i>	13	-0,011	-0,036	0,97
IgA & mRNA <i>TGF-β1</i>	12	0,273	0,896	0,39
IgG & mRNA <i>TGF-β1</i>	12	0,035	0,110	0,91
IgM & mRNA <i>TGF-β1</i>	12	-0,343	-1,156	0,27
γ-glob & mRNA <i>TGF-β1</i>	11	0,241	0,746	0,47
B. calk / <i>T. protein</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,069	0,496	0,62
Albumina / <i>Albumin</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	57	0,135	0,977	0,33

Natomiast dla chorych z CD nie stwierdzono żadnych istotnych zależności między badanymi parametrami laboratoryjnymi a poziomem mRNA genu *TGF-β1* ocenionym w błonie śluzowej zmienionego chorobowo jelita. Wyniki przedstawiono w tabeli 34.

Tab. 34. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (mRNA *TGF-β1*) a badane parametry laboratoryjne dla chorych z CDTabl. 34. *TGF-β1* gene mRNA level and laboratory parameters in CD group

Parametry laboratoryjne <i>Laboratory parameters</i>	N	R	t(N-2)	poziom p <i>P-level</i>
WBC & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,163	0,903	0,37
Fe & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,067	0,366	0,72
Neutro & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,088	-0,459	0,65
Eos & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,351	1,949	0,06
Limf & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,022	-0,117	0,91
Mono & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,218	1,161	0,26
HGB & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,098	0,541	0,59
Hct & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,004	-0,020	0,98
PLT & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,207	1,161	0,25
CRP & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,059	-0,322	0,75
OB (<i>ESR</i>) & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,056	0,291	0,77
ALT & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,046	-0,250	0,80
AST & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,302	-1,140	0,27
GGTP & mRNA <i>TGF-β1</i>	7	-0,357	-0,854	0,43
IgA & mRNA <i>TGF-β1</i>	7	-0,214	-0,490	0,64
IgG & mRNA <i>TGF-β1</i>	7	0,714	2,282	0,07
IgM & mRNA <i>TGF-β1</i>	6	0,028	0,057	0,96
γ-glob & mRNA <i>TGF-β1</i>	12	0,140	0,447	0,66
B. calk / <i>T. protein</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	0,229	1,221	0,23
Albumina / <i>Albumin</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	33	-0,002	-0,010	0,99

4.3.7.2. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a badane parametry laboratoryjne w grupie chorych z PZW

W tej grupie badanej wykazano dodatnią korelację między poziomem mRNA genu *TGF-β1* w bioptacie wątroby a wartością OB ($R=0,7901$, $p=0,002$) oraz aktywnością ALT ($R=0,603$, $p=0,02$) (tab. 35). Analizy nie przeprowadzono w obrębie poszczególnych podgrup pacjentów z PZW ze względu na ich małą liczebność.

Tab. 35. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (mRNA *TGF-β1*) a badane parametry laboratoryjne dla chorych z PZW

Tabl. 35. *TGF-β1* gene mRNA level and laboratory parameters in Ch.h. group

Parametry laboratoryjne <i>Laboratory parameters</i>	N	R	t(N-2)	poziom p <i>P-level</i>
WBC & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,0910	-0,303	0,77
Fe & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,212	-0,718	0,49
Neutro & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,140	0,471	0,65
Eos & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,098	0,310	0,76
Limf & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,146	-0,489	0,63
Mono & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,182	-0,613	0,55
HGB & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,354	-1,254	0,24
Hct & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,310	-1,083	0,30
PLT & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,086	0,285	0,78
CRP & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,430	1,579	0,14
OB (<i>ESR</i>) & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,790	4,076	0,002
ALT & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,603	2,509	0,03
AST & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,493	1,880	0,09
GGTP & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,148	0,496	0,63
IgA & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,077	0,244	0,81
IgG & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,105	0,349	0,73
IgM & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,036	-0,100	0,92
γ-glob & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,179	0,603	0,56
B. calk / <i>T. protein</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	0,490	1,947	0,08
Albumina / <i>Albumin</i> & mRNA <i>TGF-β1</i>	14	-0,134	-0,469	0,65

4.3.8. Poziom mRNA genu *TGF-β1* oznaczany u tych samych pacjentów z NZJ w wycinkach błony śluzowej jelita w aktywnym okresie choroby i w remisji

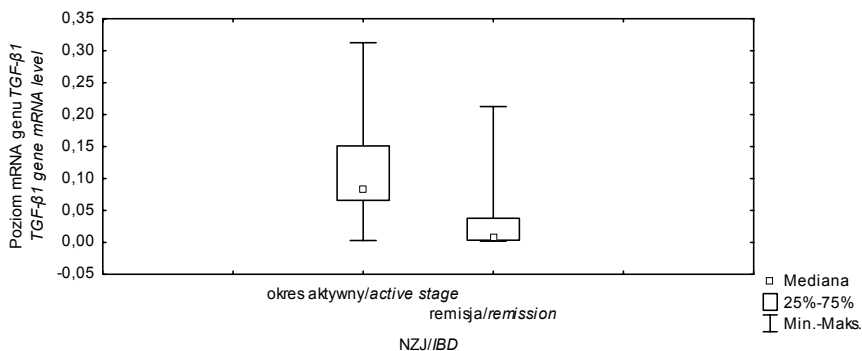
4.3.8.1. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w aktywnym okresie choroby (wycinek błony śluzowej jelita makroskopowo zmienionego) i w czasie remisji

Do analizy wykorzystano dane dotyczące 10 pacjentów, u których dokonano dwukrotnego pomiaru poziomu mRNA genu *TGF-β1*: 1) w okresie aktywnym choroby i 2) w okresie remisji choroby. W okresie aktywnym choroby obserwowano statystycznie wyższy poziom mRNA genu *TGF-β1* w porównaniu z wynikami uzyskanymi u tych samych chorych w czasie remisji choroby ($p=0,004$) (tab. 36, ryc 50, 51).

Tab. 36. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z NZJ badany w aktywnym okresie choroby (1) i w remisji (2)

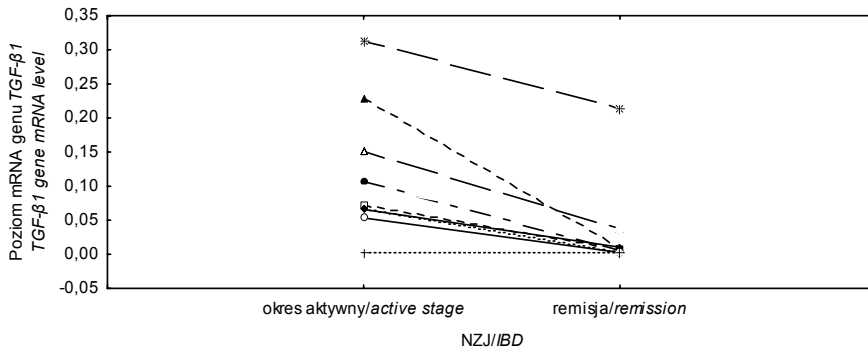
Tabl. 36. *TGF-β1* gene mRNA level in IBD patients measured twice: during active disease (1) and in the remission (2)

Poziom mRNA genu <i>TGF-β</i> <i>TGF-β1</i> gene mRNA level	N	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>	Min.	Max	SD
TGF-β1 (1)	10	0,11557	0,08453	0,00291	0,31250	0,09229
TGF-β1 (2)	10	0,03305	0,00906	0,00191	0,21250	0,06448



Ryc. 50. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z NZJ badany w aktywnym okresie choroby i w remisji (analiza zbiorcza)

Fig. 50. *TGF-β1* gene mRNA level in IBD patients measured twice: during active stage and in the remission (collective data)



Ryc. 51. Poziom mRNA genu *TGF-β1* u pacjentów z NZJ badany w aktywnym okresie choroby i w remisji (analiza indywidualna)

Fig. 51. *TGF-β1* gene mRNA level in IBD patients measured twice: during active stage and in the remission (individual data)

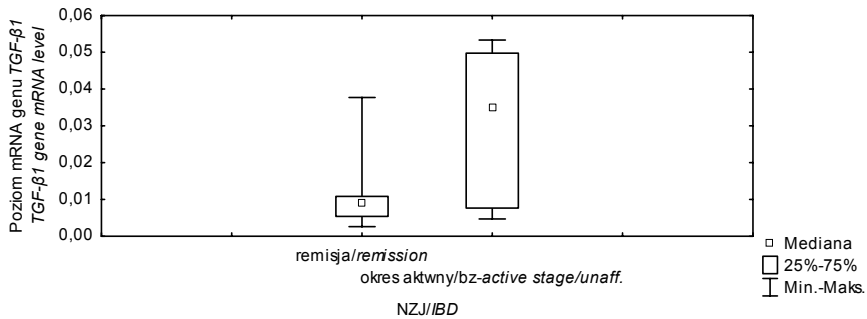
4.3.8.2. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinku błony śluzowej jelita makroskopowo niezmiennego w aktywnym okresie choroby – (akt/bz) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w okresie remisji choroby u tych samych pacjentów z NZJ

Do analizy wykorzystano dane dotyczące 6 pacjentów, u których dokonano pomiaru poziomu mRNA genu *TGF-β1* w okresie aktywnym choroby w wycinkach błony śluzowej jelita niezmiennego chorobowo oraz w czasie remisji. Znamienne wyższy poziom mRNA genu *TGF-β1* wykazano w wycinkach pobranych z jelit makroskopowo niezmiennych w aktywnym okresie choroby (akt/bz) wobec pomiarów wykonanych u tych samych pacjentów w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych w czasie remisji choroby ($p=0,04$) (tab. 37, ryc. 52, 53).

Tab. 37. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z miejsc makroskopowo niezmiennych w aktywnym okresie choroby (akt/bz) i w okresie remisji choroby u tych samych pacjentów z NZJ

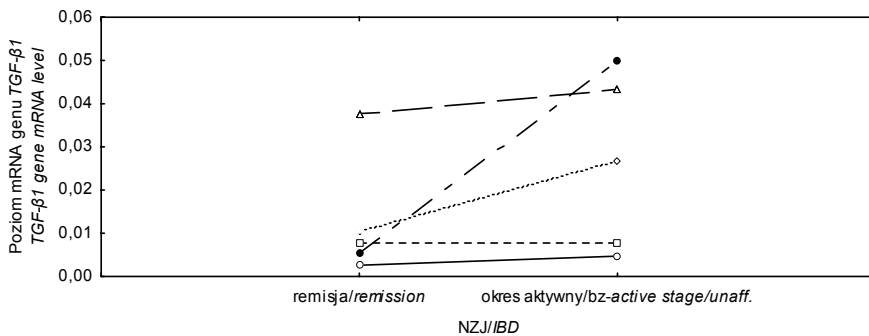
Tabl. 37. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the unaffected area (during active stage of disease) and in the remission in the same IBD patients

Okres choroby Stage of disease	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
Remisja Remission	6	0,01246	0,00906	0,00262	0,03773	0,01276
Aktywny (akt/bz) Active phase – unaffected area	6	0,03092	0,03501	0,00472	0,05336	0,02126



Ryc. 52. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z miejsc makroskopowo niezmiennych w aktywnym okresie choroby (akt/bz) i w okresie remisji choroby u tych samych pacjentów z NZJ (analiza zbiorcza)

Fig. 52. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the unaffected area during active stage of disease (active stage/unaff.) and in the remission in the same IBD patients (collective data)



Ryc. 53. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z miejsc makroskopowo niezmiennych w aktywnym okresie choroby (akt/bz) i w okresie remisji choroby u tych samych pacjentów z NZJ (analiza indywidualna)

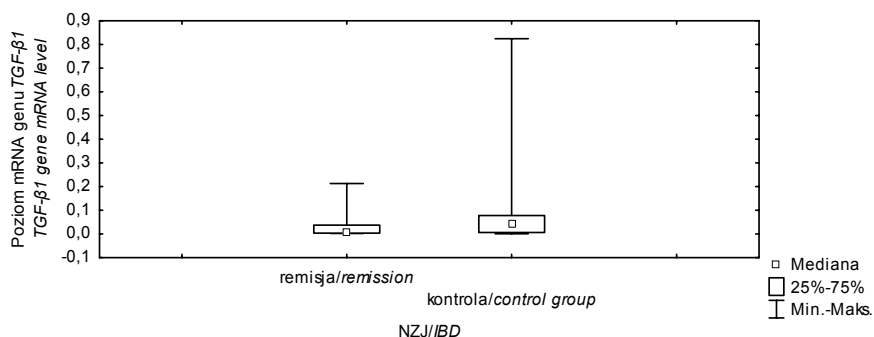
Fig. 53. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the unaffected area during active stage of disease (active stage/unaff.) and in the remission the same IBD patients (individual data)

4.3.8.3. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelita w okresie remisji oraz w grupie kontrolnej

Nie obserwowano natomiast statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* między grupą kontrolną a pacjentami z NZJ, u których badanie wykonywano w okresie remisji choroby, jednak poziom istotności był na granicy znamienności statystycznej ($p=0,05$) (tab. 38, ryc. 54).

Tab. 38. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i u pacjentów z NZJ w okresie remisji choroby
 Tabl. 38. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in IBD patients in the remission

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
Grupa kontrolna Control group	40	0,08591	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
Pacjenci z NZJ w okresie remisji IBD – remission	10	0,03305	0,00906	0,00192	0,21250	0,06448



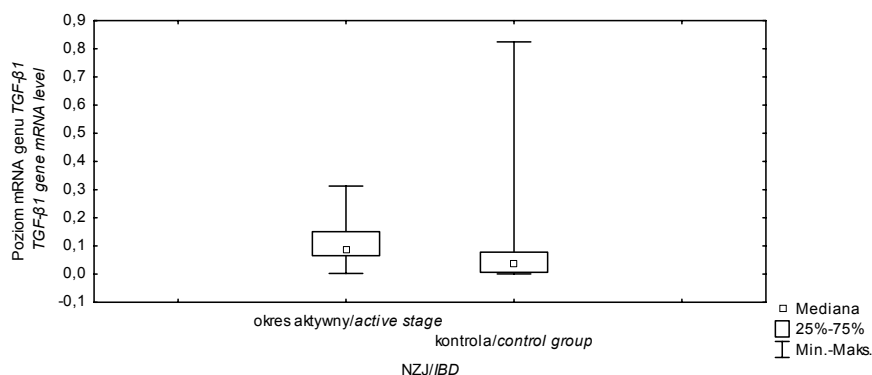
Ryc. 54. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w grupie kontrolnej i u pacjentów z NZJ w okresie remisji choroby
 Fig. 54. *TGF-β1* gene mRNA level in the control group and in IBD patients in the remission

4.3.8.4. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelita w okresie aktywnym choroby oraz w grupie kontrolnej

Podobnie jak w całej badanej grupie chorych z NZJ, także u pacjentów, u których badanie wykonano dwukrotnie, obserwowano statystycznie istotną różnicę poziomów mRNA genu *TGF-β1* oznaczonych w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych w aktywnym okresie choroby wobec pomiarów wykonanych w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych w grupie kontrolnej ($p=0,03$) (tab. 39, ryc 55).

Tab. 39. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito makroskopowo zmienione w aktywnym okresie choroby) u pacjentów z NZJ i w grupie kontrolnej
 Tabl. 39. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected area (during active stage of disease) and in the control group

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
Grupa kontrolna Control group	40	0,08591	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
Aktywny okres choroby, jelito zmienione makroskopowo Active stage of disease – affected area	10	0,11557	0,08454	0,00291	0,31250	0,09229



Ryc. 55. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito makroskopowo zmienione w aktywnym okresie choroby) u pacjentów z NZJ i w grupie kontrolnej

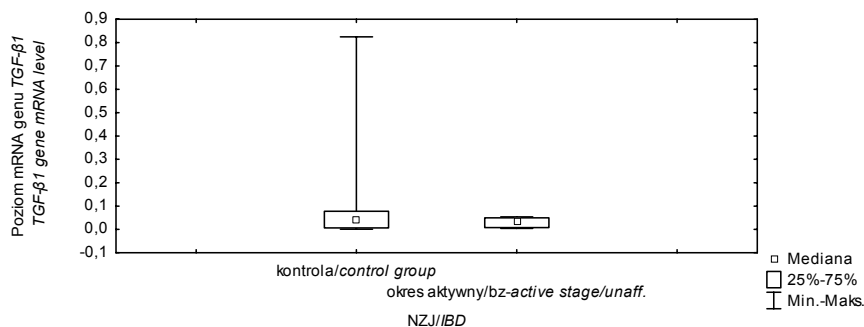
Fig. 55. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the affected area (during active stage of disease) and in the control group

Nie obserwowano natomiast statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* mierzonych w wycinkach błony śluzowej niezmiennych makroskopowo jelit pobranych w aktywnym okresie choroby wobec pomiarów wykonanych w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych w grupie kontrolnej ($p=0,74$) (tab. 40, ryc. 56).

Tab. 40. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito makroskopowo niezmiennione w aktywnym okresie choroby) u pacjentów z NZJ i w grupie kontrolnej

Tabl. 40. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the unaffected area (during active stage of disease) and in the control group

Grupa Group	N	Średnia Mean	Mediana Median	Min.	Max	SD
Grupa kontrolna Control group	40	0,08591	0,04028	0,00103	0,82469	0,16012
Aktywny okres choroby, jelito niezmiennione makroskopowo Active stage of disease – affected area	10	0,03092	0,03501	0,00472	0,05336	0,02126



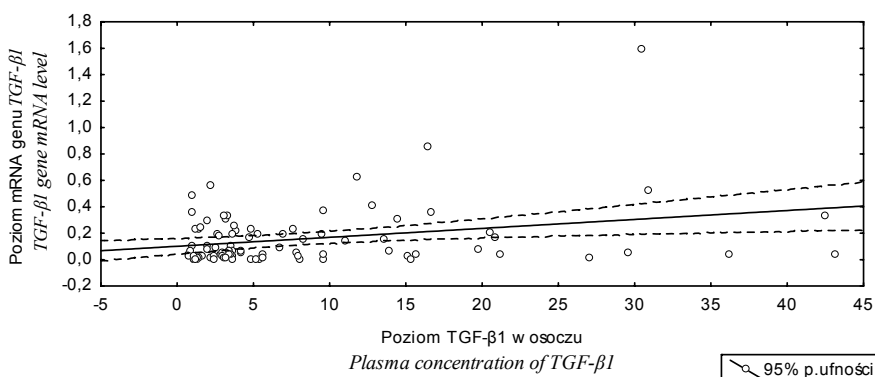
Ryc. 56. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito makroskopowo niezmienione w aktywnym okresie choroby – aktywny/bz) u pacjentów z NZJ i w grupie kontrolnej

Fig. 56. *TGF-β1* gene mRNA level in specimens from the unaffected area during active stage of disease (active stage/unaff.) and in the control group

4.4. Stężenie TGF-β1 w osoczu a poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby

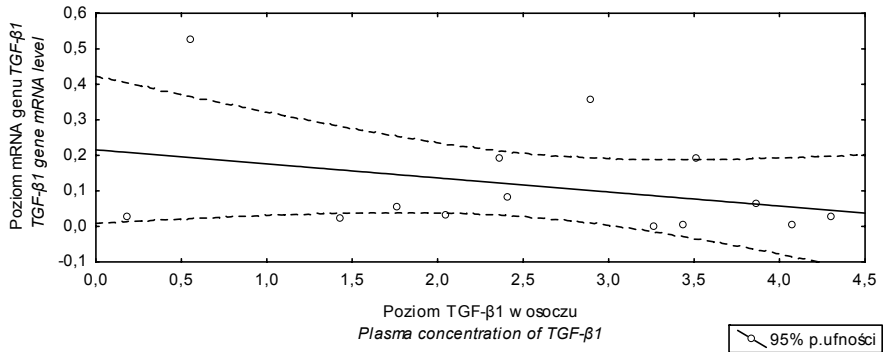
4.4.1. Stężenie TGF-β1 w osoczu a poziom mRNA genu *TGF-β1* u chorych z NZJ (w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych) oraz u pacjentów z PZW

Nie obserwowano statystycznie istotnej korelacji stężenia TGF-β1 w osoczu z poziomem mRNA genu *TGF-β1* w grupie chorych z NZJ (N=90; $R_s=0,19$; $p=0,07$, ryc. 57) ani z PZW (N=14; $R_s=-0,23$; $p=0,43$, ryc. 58) oraz w obrębie badanych podgrup chorych (CD – N=33; $R_s=0,07$; $p=0,71$; ryc. 59, UC N=57; $R_s=0,24$; $p=0,08$; ryc. 60). Ze względu na małą liczebność grup nie przeprowadzono podobnej analizy w podgrupach chorych z PZW.

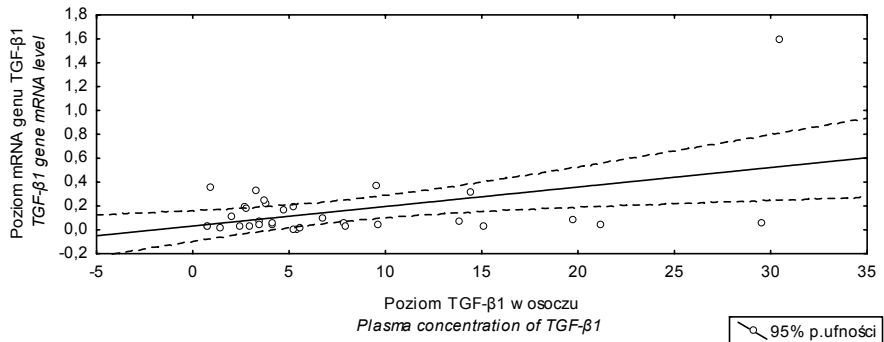


Ryc. 57. Korelacja stężenia *TGF-β1* (ng/ml) z poziomem mRNA genu *TGF-β1* w grupie NZJ

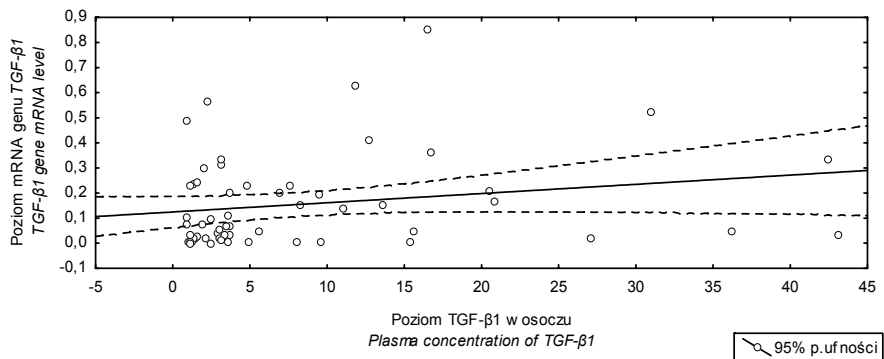
Fig. 57. Plasma concentration of *TGF-β1* (ng/ml) in relation to *TGF-β1* gene mRNA level in IBD patients



Ryc. 58. Korelacja stężenia TGF- β 1 z poziomem mRNA genu *TGF- β 1* w grupie PZW
 Fig. 58. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to TGF- β 1 gene mRNA level in Ch. h. patients



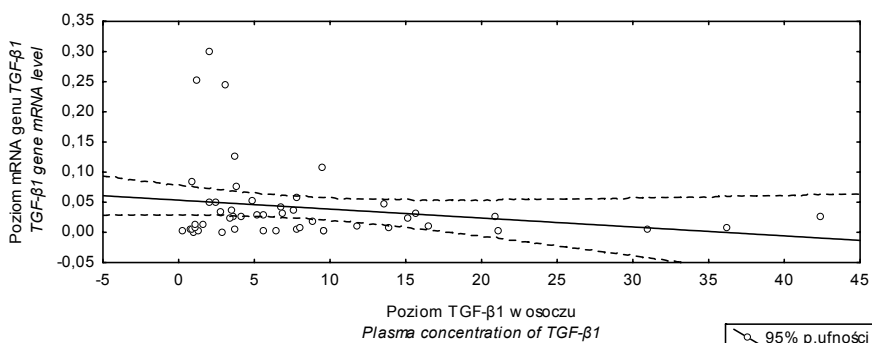
Ryc. 59. Korelacja stężenia TGF- β 1 (ng/ml) z poziomem mRNA genu *TGF- β 1* w podgrupie CD
 Fig. 59. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to TGF- β 1 gene mRNA level in CD patients



Ryc. 60. Korelacja stężenia TGF- β 1 (ng/ml) z poziomem mRNA genu *TGF- β 1* w podgrupie UC
 Fig. 60. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to TGF- β 1 gene mRNA level in UC patients

4.4.2. Stężenie TGF- β 1 w osoczu a poziom mRNA genu *TGF- β 1* u chorych z NZJ w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo niezmienionych, w aktywnym okresie choroby

Nie obserwowano również statystycznie istotnej korelacji stężenia *TGF- β 1* w osoczu z poziomem mRNA genu *TGF- β 1* (N=49; $R_s = -0,06$; $p = 0,67$, ryc. 61), gdy wycinek został pobrany w aktywnym okresie choroby, ale pochodził z jelita ocenionego jako niezmienione w badaniu kolonoskopowym.

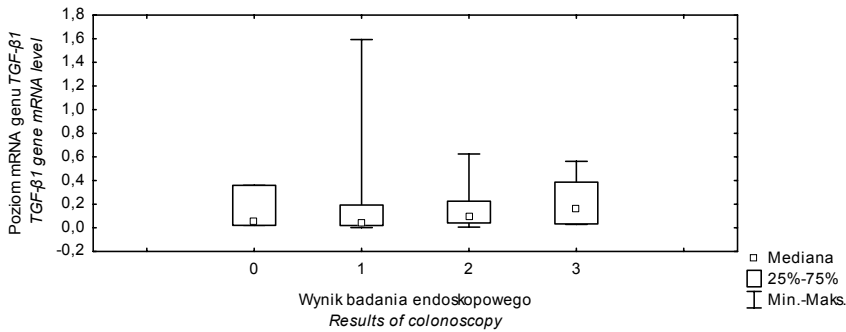


Ryc. 61. Korelacja stężenia TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu z poziomem mRNA genu *TGF- β 1* u chorych z NZJ (jelito makroskopowo niezmienione w aktywnym okresie choroby)

Fig. 61. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to TGF- β 1 gene mRNA level in IBD patients (unaffected area) during active stage of disease

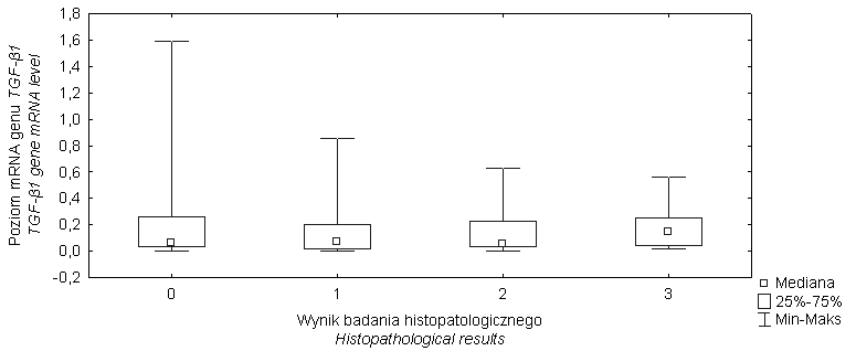
4.5. Poziom mRNA genu *TGF- β 1* a wyniki badania endoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ

W całej grupie pacjentów z NZJ nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF- β 1* (ocenianego w aktywnym okresie choroby w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych) w zależności od wyniku badania endoskopowego ($p = 0,23$, ryc. 62) oraz od wyniku badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit ($p = 0,24$, ryc. 63).



Ryc. 62. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania endoskopowego pacjentów z NZJ

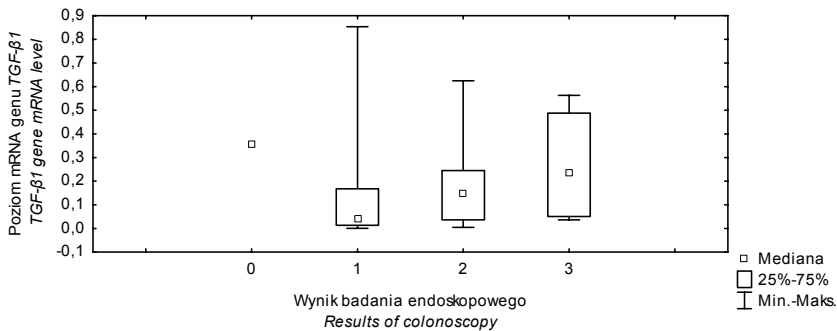
Fig. 62. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the results of colonoscopy in IBD patients (affected area)



Ryc. 63. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania histopatologicznego wycinka błony śluzowej jelita u pacjentów z NZJ

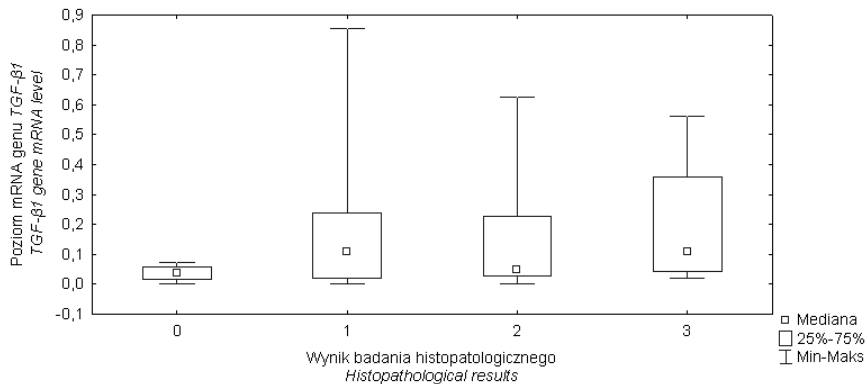
Fig. 63. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the histopathological results in IBD patients (affected area)

Również w podgrupie chorych z UC nie obserwowano istotnych różnic między poziomem mRNA genu *TGF-β1* w zależności od wyniku kolonoskopii ($p=0,06$, ryc. 64) oraz badania histopatologicznego wycinka błony śluzowej jelita ($p=0,57$, ryc. 65).



Ryc. 64. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania endoskopowego w podgrupie UC

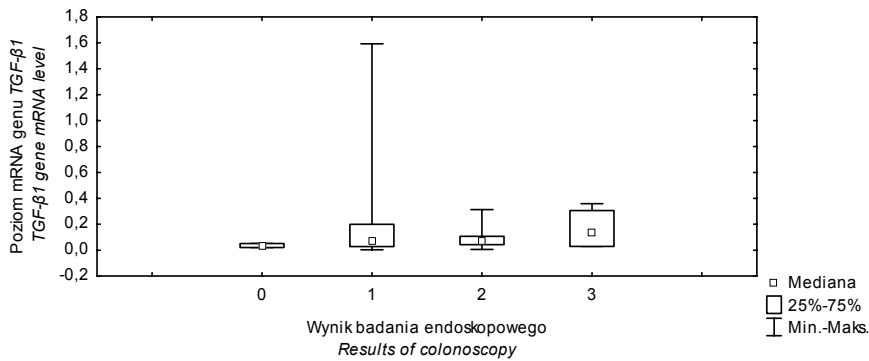
Fig. 64. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the results of colonoscopy in UC patients (affected area)



Ryc. 65. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania histopatologicznego u pacjentów z UC

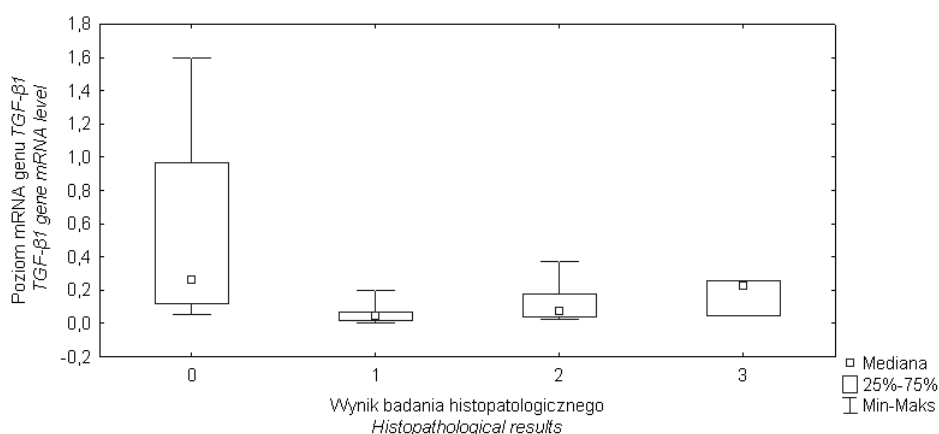
Fig. 65. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the histopathological results in UC patients (affected area)

Podobnie u pacjentów z CD nie obserwowano znamiennej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* w zależności od wyniku badania kolonoskopowego ($p=0,66$, ryc. 66) oraz badania histopatologicznego wycinka błony śluzowej jelita ($p=0,23$, ryc. 67).



Ryc. 66. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania endoskopowego w podgrupie CD

Fig. 66. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the results of colonoscopy in CD patients (affected area)



Ryc. 67. Poziom mRNA genu *TGF-β1* (jelito zmienione chorobowo) w zależności od wyniku badania histopatologicznego wycinka błony śluzowej jelita u pacjentów z CD

Fig. 67. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to the histopathological results in CD patients (affected area)

4.6. Badanie immunohistochemiczne (IHC) na obecność TGF-β1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby

4.6.1. Wyniki badania immunohistochemicznego (IHC) w analizowanych grupach i podgrupach dzieci

Badanie IHC wykonano u 78 dzieci i otrzymano następujące wyniki: nasilenie reakcji ocenione na 1+ dla 15 badanych (19,2%), na 2+ dla 39 badanych (50,0%) oraz na 3+ dla 24 dzieci (30,8%). Obserwowano statystycznie istotną różnicę nasilenia reakcji IHC pomiędzy badanymi grupami dzieci ($p=0,04$). W grupie pacjentów z PZW wykazano mniejsze nasilenie reakcji IHC w porównaniu z innymi badanymi grupami. Nie obserwowano natomiast statystycznie istotnej różnicy nasilenia reakcji IHC pomiędzy podgrupami CD i UC w grupie chorych z NZJ ($p=0,72$). W przypadku PZW nie przeprowadzano analizy dla poszczególnych podgrup, ze względu na małą ich liczebność (tab. 41).

Tab. 41. Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w badanych grupach i podgrupach dzieciTabl. 41. Immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in the study groups and subgroups

Grupa / Group	N (%)			
	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	Razem / Total
NZJ / IBD	8 (15,09%)	27 (50,94%)	18 (33,96%)	53
UC	7 (18,92%)	17 (45,95%)	13 (35,14%)	37
CD	1 (6,25%)	10 (62,50%)	5 (31,25%)	16
K / Control	3 (15,79%)	10 (52,63%)	6 (31,58%)	19
PZW / Ch.h.	4 (66,67%)	2 (33,33%)	0 (0%)	6
Razem / Total	15	39	24	78

4.6.2. Wyniki badania immunohistochemicznego (IHC) na obecność TGF- β 1 a aktywność choroby u pacjentów z NZJ

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy nasilenia reakcji IHC w zależności od aktywności choroby w całej grupie NZJ ($p=0,84$, tab. 42) oraz oddzielnie dla pacjentów z CD i UC (odpowiednio $p=0,19$, tab. 43 i $p=0,35$, tab. 44).

Tab. 42 Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w zależności od aktywności choroby u pacjentów z NZJTabl. 42. Immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in relation to disease activity in IBD patients

Aktywność choroby Disease activity	N (%)			
	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	Razem / Total
0	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	4
1	5 (13,89%)	20(55,56%)	11 (30,56%)	36
2	2 (22,22%)	3 (33,33%)	4 (44,44%)	9
3	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	4
Razem / Total	8	27	18	53

Tab. 43. Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w zależności od aktywności choroby u pacjentów z CDTabl. 43. Immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in relation to disease activity in CD patients

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	N (%)			
	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	Razem / Total
0	1 (33,33%)	2 (66,67%)	0 (0%)	3
1	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	10
2	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
3	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2
Razem / Total	1	10	5	16

Tab. 44. Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w zależności od aktywności choroby u pacjentów z UCTabl. 44. Immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in relation to disease activity in UC patients

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	N (%)			
	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	Razem / Total
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
1	5 (18,52%)	15 (55,55%)	7 (25,93%)	27
2	2 (25%)	3 (37,50%)	3 (37,50%)	8
3	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	2
Razem / Total	7	18	12	37

4.6.3. Wyniki badania immunohistochemicznego (IHC) na obecność TGF- β 1 a faza choroby u pacjentów z NZJ

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy nasilenia reakcji IHC w zależności od fazy choroby w całej grupie pacjentów z NZJ ($p=0,23$, tab. 45).

Tab. 45. Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w zależności od fazy choroby u pacjentów z NZJTabl. 45. Immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in relation to the stage of disease in IBD group

Aktywność choroby <i>Disease activity</i>	N (%)			
	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	Razem / Total
P (początek) / <i>Presentation</i>	4 (22,22%)	9 (50%)	5 (27,78%)	18
N (nawrót) / <i>Relapse</i>	1 (4%)	13 (52%)	11 (44%)	25
K/R (remisja) / <i>Remission</i>	3 (30%)	5 (50%)	2 (20%)	10
Razem / Total	8	27	18	53

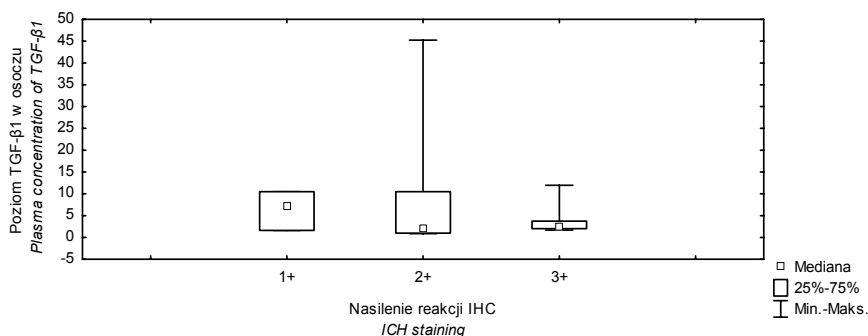
4.7. Wyniki badania immunohistochemicznego (IHC) na obecność TGF- β 1 a stężenie TGF- β 1 w osoczu w badanych grupach dzieci.

W całej grupie badanej (NZJ, PZW, K) nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy wartości stężenia TGF- β 1 w osoczu w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność TGF- β 1 ($p=0,49$) (tab. 46, ryc. 68, 69, 70). Nie obserwowano także znamiennej różnicy wartości stężenia TGF- β 1 w osoczu w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w obrębie poszczególnych badanych grup: kontrolnej ($p=0,83$), chorych z NZJ ($p=0,74$) jak i wśród pacjentów z PZW ($p=0,36$) (tab. 46, ryc. 68, 69, 70).

Tab. 46. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność TGF- β 1 dla całej badanej grupy dzieci

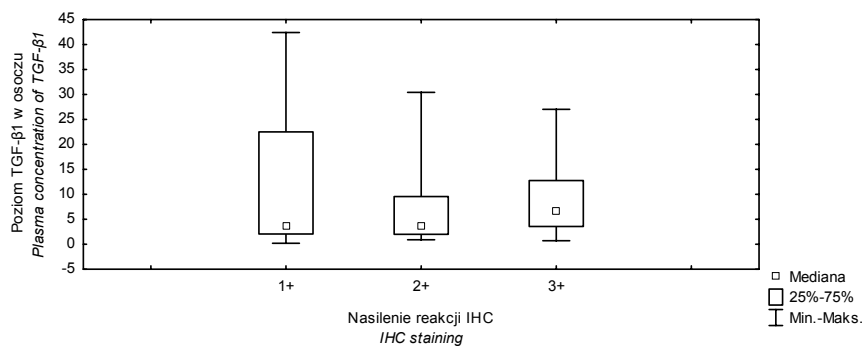
Tabl. 46 Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in the study group

Nasilenie IHC <i>IHC staining</i>	N	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>	Min.	Max	SD
1+	15	8,26	2,89	0,18	42,42	13,03
2+	39	7,39	3,53	0,88	45,22	9,46
3+	24	7,43	4,23	0,72	27,03	6,82



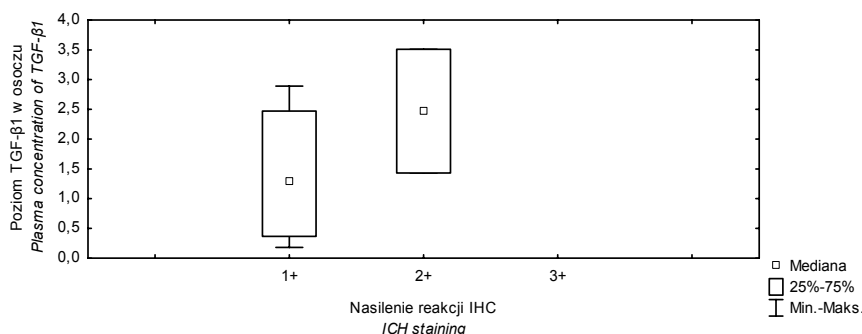
Ryc. 68. Stężenie TGF- β 1 (ng/ml) w osoczu a nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 w grupie kontrolnej

Fig. 68. Plasma concentration of TGF- β 1 (ng/ml) in relation to immunohistochemical (IHC) staining for TGF- β 1 in the control group



Ryc 69. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a nasilenie reakcji IHC na obecność TGF-β1 w grupie chorych z NZJ

Fig. 69. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to immunohistochemical (IHC) staining for TGF-β1 in IBD group

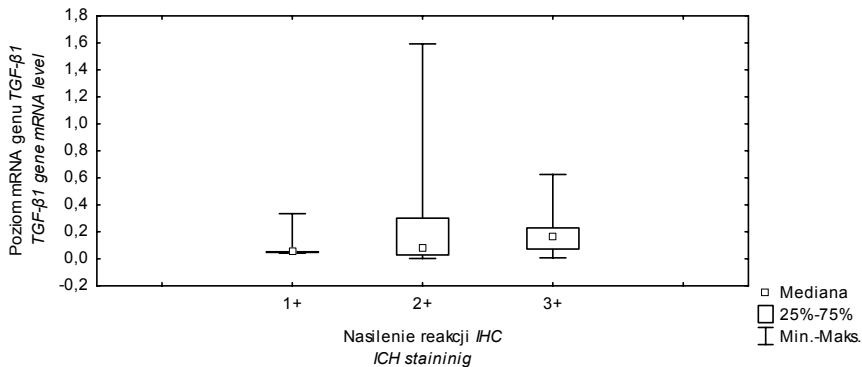


Ryc. 70. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a nasilenie reakcji IHC na obecność TGF-β1 w grupie chorych z PZW

Fig. 70. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to immunohistochemical (IHC) staining for TGF-β1 in Ch.h. group

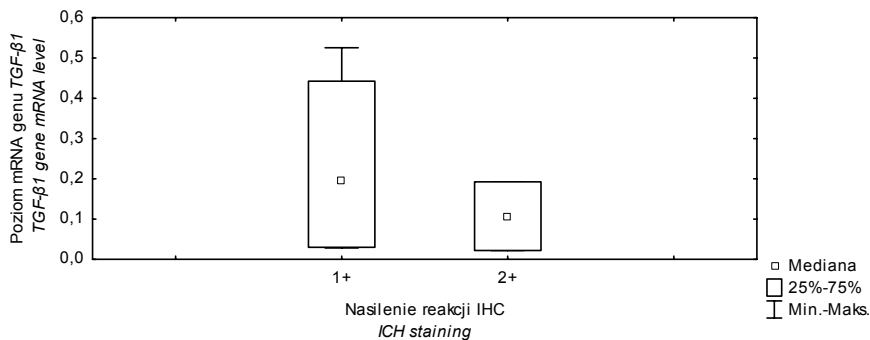
4.7.1. Badanie immunohistochemiczne (IHC) na obecność TGF-β1 a poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych chorobowo i w tkance wątrobowej

W grupie chorych z NZJ ($p=0,63$) i u pacjentów z PZW ($p=0,35$) nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* w zależności od nasilenia reakcji immunohistochemicznej IHC (ryc. 71, 72).



Ryc. 71. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność *TGF-β1* w grupie chorych NZJ

Fig. 71. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in IBD group

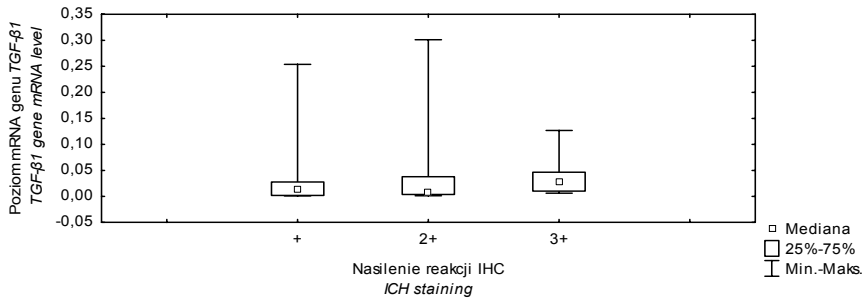


Ryc. 72. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność *TGF-β1* w grupie chorych z PZW

Fig. 72. *TGF-β1* gene mRNA level in relation to immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in Ch. h. patients

4.7.2. Badanie immunohistochemiczne (IHC) na obecność *TGF-β1* u pacjentów z NZJ a poziom mRNA genu *TGF-β1* (w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo niezmiennych chorobowo pobranych w aktywnym okresie choroby)

W grupie chorych z NZJ nie obserwowano także statystycznie istotnej różnicy poziomu mRNA genu *TGF-β1* badanego w tkance makroskopowo niezmiennych chorobowo w zależności od nasilenia reakcji immunohistochemicznej IHC ($p=0,28$) (ryc. 73).



Ryc. 73. Poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo niezmiennionych, pobranych w aktywnym okresie choroby w zależności od nasilenia reakcji IHC na obecność *TGF-β1* u pacjentów z NZJ

Fig. 73. *TGF-β1* gene mRNA level (active disease – unaffected area) in relation to immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in IBD patients

4.7.3. Badanie immunohistochemiczne na obecność *TGF-β1* a wyniki badania endoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ

U pacjentów z NZJ nie obserwowano statystycznie istotnej zależności między nasileniem reakcji IHC a wynikiem badania endoskopowego ($p=0,56$) (tab. 47) ani zależności między nasileniem reakcji IHC a wynikiem badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit ($p=0,36$) (tab. 48).

Tab. 47. Zależność badania IHC od wyniku kolonoskopii (K) w grupie NZJ

Tabl. 47. Immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in relation to the results of colonoscopy (K) in IBD patients

Nasilenie reakcji IHC <i>IHC staining</i>	Wynik K / <i>Result K</i>				Razem <i>Total</i>
	0	1	2	3	
1	1 (12,50%)	4 (50%)	3 (37,50%)	0 (0%)	8
2	0 (0%)	14 (51,85%)	11 (40,74%)	2 (7,41%)	27
3	1 (5,56%)	6 (33,33%)	9 (50%)	2 (11,11%)	18
Razem / <i>Total</i>	2	24	23	4	53

Tab. 48. Zależność badania IHC od wyniku badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit (HP) w grupie NZJ

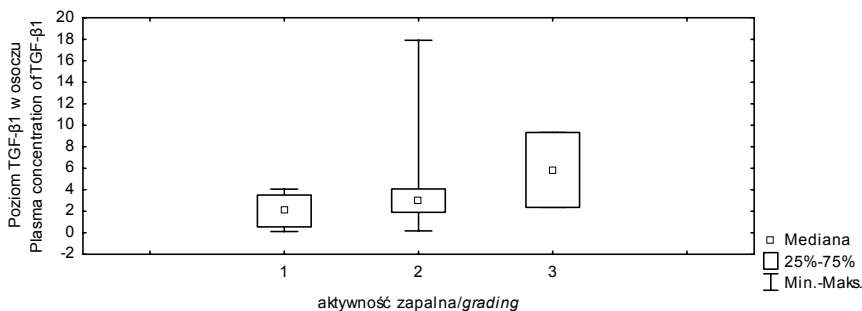
Tabl. 48. Immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in relation to histopathological results (HP) in IBD patients

Nasilenie reakcji IHC <i>IHC staining</i>	Wynik HP / <i>Result HP</i>				Razem <i>Total</i>
	0	1	2	3	
1	3 (37,50%)	2 (25%)	3 (37,50%)	0 (0%)	8
2	3 (11,11%)	12 (44,44%)	10 (37,04%)	2 (7,41%)	27
3	1 (5,56%)	6 (33,33%)	9 (50%)	2 (11,11%)	18
Razem / <i>Total</i>	7	20	22	4	53

4.8. Stężenie *TGF-β1* w osoczu, poziom mRNA genu *TGF-β1* oraz nasilenia reakcji IHC na obecność *TGF-β1* a aktywność zapalna oraz nasilenie włóknienia w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

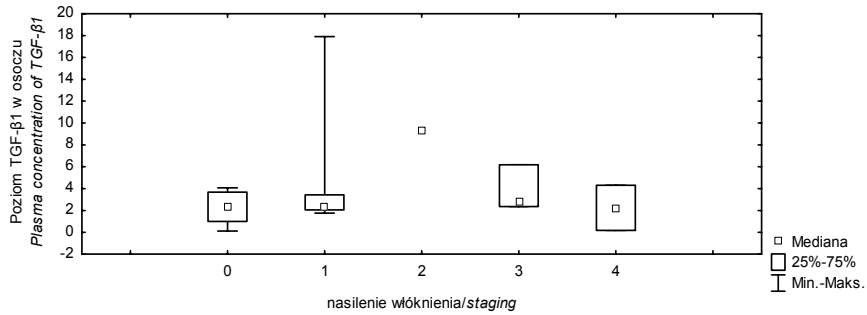
Nie obserwowano statystycznie istotnej zależności:

- stężenia *TGF-β1* w osoczu od aktywności zapalnej (grading) (N=21; $R_s=0,25$; $p=0,27$; Ryc. 74) ani od nasilenia włóknienia (staging) (N=21; $R_s=0,16$; $p=0,49$; Ryc. 75),
- poziomu mRNA genu *TGF-β1* od aktywności zapalnej (grading) (N=14; $R_s= -0,31$; $p=0,28$; ryc. 76) ani od nasilenia włóknienia (staging) (N=14; $R_s= -0,27$; $p=0,34$; ryc. 77),
- nasilenia reakcji IHC na obecność *TGF-β1* od aktywności zapalnej (grading) (N=6; $R_s=0,22$; $p=0,67$; tab. 49) ani od nasilenia włóknienia (staging) (N=6; $R_s= -0,49$; $p=0,32$; tab. 50).



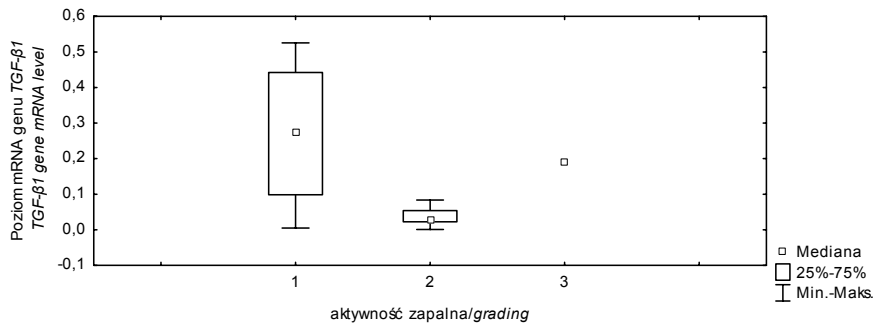
Ryc. 74 Stężenie *TGF-β1* (ng/ml) w osoczu a aktywność zapalna w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

Fig. 74. Plasma concentration of *TGF-β1* (ng/ml) in relation to grading in liver biopsies in Ch. h. patients



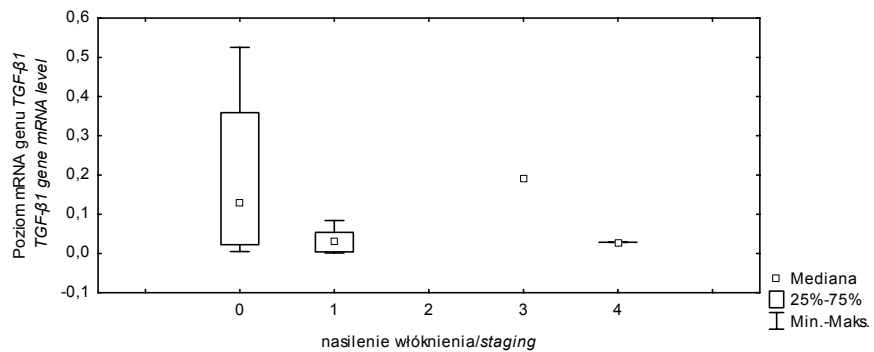
Ryc. 75. Stężenie TGF-β1 (ng/ml) w osoczu a nasilenie włóknienia w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

Fig. 75. Plasma concentration of TGF-β1 (ng/ml) in relation to staging in liver biopsy in Ch. h. patients



Ryc. 76. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a aktywność zapalna w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

Fig. 76. TGF-β1 gene mRNA level in relation to grading in liver biopsy in Ch. h. patients



Ryc. 77. Poziom mRNA genu *TGF-β1* a nasilenie włóknienia w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

Fig. 77. TGF-β1 gene mRNA level in relation to staging in liver biopsy in Ch. h. patients

Tab. 49. Nasilenie reakcji IHC na obecność *TGF-β1* a aktywność zapalna w wycinkach wątroby w grupie pacjentów z PZW

Tabl. 49. Immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in relation to grading in liver biopsy in Ch. h. patients

Aktywność zapalna / Grading	Liczba badanych / Number of patients		
	IHC 1+	IHC 2+	Razem / Total
1	2 (66,67%)	1 (33,33%)	3
2	2 (66,67%)	1 (33,33%)	3
3	0 (0%)	0 (0%)	0
Razem / Total	4	2	6

Tab. 50. Nasilenie reakcji IHC na obecność *TGF-β1* a nasilenie włóknienia w wycinkach wątroby w grupie pacjentów z PZW

Tabl. 50. Immunohistochemical (IHC) staining for *TGF-β1* in relation to staging in liver biopsy in Ch. h. patients

Włóknienie / Staging	Liczba badanych / Number of patients		
	IHC 1+	IHC 2+	Razem / Total
0	2 (50%)	2 (50%)	4
1	1 (100%)	0 (0%)	1
2	0 (0%)	0 (0%)	0
3	0 (0%)	0 (0%)	0
4	1 (100%)	0 (0%)	1
Razem / Total	4	2	6

4.9. Analiza polimorfizmów genu *TGF-β1*

Grupę kontrolną (porównawczą) dla oznaczania polimorfizmu genu *TGF-β1* stanowiło 103 dzieci (50 dziewcząt i 53 chłopców, w wieku 3 do 18 lat, średni wiek $10,8 \pm 3,9$ lat, mediana 11,0 lat) – zawierała ona 42 dzieci stanowiących grupę kontrolną dla oznaczania poziomu *TGF-β1* w osoczu, poziomu mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit i badań immunohistochemicznych oraz dodatkowo 61 osób (wobec braku wskazań nie wykonywano u nich badania endoskopowego, w związku z czym nie weszli oni w skład ww. grupy kontrolnej). W grupie tej wykluczono również przewlekłe stany zapalne, zaburzenia immunologiczne, zaburzenia odżywienia, choroby nowotworowe oraz przyjmowanie preparatów immunomodujących w okresie 6 miesięcy poprzedzających badanie.

4.9.1. Częstość występowania poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów genu *TGF-β1* w grupach i podgrupach badanych

W celu uproszczenia, w poniższej analizie zastosowane zostało następujące oznaczenie poszczególnych polimorfizmów genu *TGF-β1*:

- T869C – polimorfizm występujący w eksonie 1, kodon 10, w pozycji „+869” substytucja tyminy na cytozynę (skutkująca zamianą aminokwasów leucyny na prolinę),
- G915C – polimorfizm występujący w eksonie 1, kodon 25, w pozycji „+915” substytucja guaniny na cytozynę (powodująca zamianą aminokwasów argininy na prolinę),
- G-800A – polimorfizm w rejonie promotorowym, w pozycji „-800”, substytucja guaniny na adeninę,
- C-509T – polimorfizm w rejonie promotorowym, w pozycji „-509”, substytucja cytozyny na tyminę.

Poszczególne genotypy dla badanych polimorfizmów oznaczono w następujący sposób:

- 11 – homozygota dzika (TT – „+869”, GG – „+915”, GG – „-800”, CC – „-509”),
- 10 – heterozygota (TC – „+869”, GC – „+915”, GA – „-800”, CT – „-509”),
- 00 – homozygota z mutacją (CC – „+869”, CC – „+915”, AA – „-800”, TT – „-509”).

Częstość występowania polimorfizmów genu *TGF-β1* ustalono dla 207 osób i przedstawiono w tabeli 51.

Tab. 51. Częstość występowania poszczególnych rodzajów polimorfizmów genu *TGF-β1* w całej badanej populacji

Tab. 51. *The frequency of genotypes of TGF-β1 polymorphisms in the study group*

Polimorfizm <i>Polymorphism</i>	Homozygota dzika <i>Wild type homozygote</i>	Heterozygota <i>Heterozygote</i>	Homozygota – mutacja <i>Mutation homozygote</i>	Razem <i>Total</i>
T869C	65 (31,4%)	97 (46,9%)	45 (21,7%)	207
G915C	180 (87,0%)	26 (12,6%)	1 (0,5%)	207
G-800A	185 (89,4)	21 (10,1%)	1 (0,5%)	207
C-509T	83 (40,1%)	88 (42,5%)	36 (17,4%)	207

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy badanymi grupami w zakresie polimorfizmu T869C ($p=0,10$; tab. 52), G915C ($p=0,84$, tab. 53), G-800A ($p=0,42$, tab. 54), obserwowano natomiast w zakresie polimorfizmu C-509T ($p=0,04$; tab. 55).

Tab. 52. Występowanie genotypów polimorfizmu T869 genu *TGF-β1* w badanych grupach
 Tab. 52. The frequency of genotypes of *TGF-β1* T869C polymorphism in the study groups

Grupa Group	Homozygota dzika Wild type homozygote TT	Heterozygota Heterozygote TC	Homozygota – mutacja Mutation homozygote CC	Razem Total
PZW / Ch.h	10 (50,0%)	10 (50,0%)	0 (0%)	20
NZJ / IBD	23 (27,38%)	41 (48,81%)	20 (23,81%)	84
K / Control	32 (31,07%)	46 (44,66%)	25 (24,27%)	103
Razem / Total	65	97	45	207

Tab. 53. Występowanie genotypów polimorfizmu G915C genu *TGF-β1* w badanych grupach
 Tab. 53. The frequency of genotypes of *TGF-β1* G915C polymorphism in the study groups

Grupa Group	Homozygota dzika Wild type homozygote GG	Heterozygota Heterozygote CG	Homozygota – mutacja Mutation homozygote CC	Razem Total
PZW / Ch.h	18 (90%)	2 (10%)	0 (0%)	20
NZJ / IBD	72 (85,71%)	12 (14,29%)	0 (0%)	84
K / Control	90 (87,38%)	12 (11,65%)	1 (0,97%)	103
Razem / Total	180	26	1	207

Tab. 54. Występowanie genotypów polimorfizmu G-800A genu *TGF-β1* w badanych grupach
 Tab. 54. The frequency of genotypes of *TGF-β1* G-800A polymorphism in the study groups

Grupa Group	Homozygota dzika Wild type homozygote GG	Heterozygota Heterozygote GA	Homozygota – mutacja Mutation homozygote AA	Razem Total
PZW / Ch.h	16 (80%)	4 (20%)	0 (0%)	20
NZJ / IBD	76 (90,48%)	7 (8,33%)	1 (1,19%)	84
K / Control	93 (90,29%)	10 (9,71%)	0 (0%)	103
Razem / Total	185	21	1	207

Tab. 55. Występowanie genotypów polimorfizmu C-509T genu *TGF-β1* w badanych grupach
 Tab. 55. The frequency of genotypes of *TGF-β1* C-509T polymorphism in the study groups

Grupa Group	Homozygota dzika Wild type homozygote CC	Heterozygota Heterozygote CT	Homozygota – mutacja Mutation homozygote TT	Razem Total
PZW / Ch.h	12 (60%)	8 (40%)	0 (0%)	20
NZJ / IBD	34 (40,48%)	30 (35,71%)	20 (23,81%)	84
K / Control	37 (35,92%)	50 (48,54%)	16 (15,53%)	103
Razem / Total	83	88	36	207

Między podgrupami pacjentów z NZJ (CD i UC) nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy częstości występowania poszczególnych genotypów w zakresie wszystkich badanych polimorfizmów genu *TGF-β1*: T869C ($p=0,96$), G915C ($p=0,34$), G-800A ($p=0,24$) ani C-509T ($p=0,15$) (tab. 56, 57, 58, 59).

Natomiast analizując podgrupy chorych z PZW (AIH, HCV i HBV) obserwowano statystycznie istotną różnicę częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu T869C genu *TGF-β1* ($p<0,05$), nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w zakresie pozostałych polimorfizmów: G915C ($p=0,81$), G-800A ($p=0,28$) ani C-509T ($p=0,30$) (tab. 56, 57, 58, 59).

Tab. 56. Występowanie genotypów polimorfizmu T869C genu *TGF-β1* w badanych podgrupach chorych z NZJ i PZW oraz w grupie kontrolnej

Tabl. 56. The frequency of genotypes of *TGF-β1* T869C polymorphism in IBD subgroups, Ch.h. patients and in the control group

Podgrupa Subgroup	Homozygota dzika Wild type homozygote TT	Heterozygota Heterozygote TC	Homozygota –mutacja Mutation homozygote CC	Razem Total
UC	15 (27,78%)	27 (50%)	12 (22,22%)	54
CD	8 (26,67%)	14 (46,67%)	8 (26,67%)	30
AIH	3 (42,86%)	4 (57,14%)	0 (0%)	7
HBV	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	10
HCV	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	3
K / Control	32 (31,07%)	46 (44,66%)	25 (24,27%)	103
Razem / Total	65	97	45	207

Tab. 57. Występowanie genotypów polimorfizmu G915C genu *TGF-β1* w badanych podgrupach chorych z NZJ i PZW oraz w grupie kontrolnej

Tabl. 57. The frequency of genotypes of *TGF-β1* G915C polymorphism in IBD subgroups, Ch.h. patients and in the control group

Podgrupa Subgroup	Homozygota dzika Wild type homozygote GG	Heterozygota Heterozygote GC	Homozygota –mutacja Mutation homozygote CC	Razem Total
UC	49 (90,74%)	5 (9,26%)	0 (0%)	54
CD	23 (76,67%)	7 (23,33%)	0 (0%)	30
AIH	6 (85,71%)	1 (14,29%)	0 (0%)	7
HBV	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10
HCV	2 (66,67%)	1 (33,33%)	0 (0%)	3
K / Control	90 (87,3%)	12 (11,65%)	1 (0,97%)	103
Razem / Total	180	26	1	207

Tab. 58. Występowanie genotypów polimorfizmu G-800A genu *TGF-β1* w badanych podgrupach chorych z NZJ i PZW oraz w grupie kontrolnej

Tabl. 58. The frequency of genotypes of *TGF-β1* G-800A polymorphism in IBD subgroups, Ch.h. patients and in the control group

Podgrupa <i>Subgroup</i>	Homozygota dzika <i>Wild type</i> homozygote GG	Heterozygota <i>Heterozygote</i> GA	Homozygota –mutacja <i>Mutation homozygote</i> AA	Razem <i>Total</i>
UC	49 (90,74%)	5 (9,26%)	0 (0%)	54
CD	27 (90%)	2 (6,67%)	1 (3,33%)	30
AIH	5 (71,43%)	2 (28,57%)	0 (0%)	7
HBV	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	10
HCV	2 (66,67%)	1 (33,33%)	0 (0%)	3
K/ <i>Control</i>	93 (90,29%)	10 (9,71%)	0 (0%)	103
Razem/ <i>Total</i>	185	21	1	207

Tab. 59. Występowanie genotypów polimorfizmu C-509T genu *TGF-β1* w badanych podgrupach chorych z NZJ i PZW oraz w grupie kontrolnej

Tabl. 59. The frequency of genotypes of *TGF-β1* C-509T polymorphism in IBD subgroups, Ch.h. patients and in the control group

Podgrupa <i>Subgroup</i>	Homozygota dzika <i>Wild type</i> homozygote CC	Heterozygota <i>Heterozygote</i> CT	Homozygota –mutacja <i>Mutation homozygote</i> TT	Razem <i>Total</i>
UC	19 (35,19%)	23 (42,59%)	12 (22,22)	54
CD	15 (50%)	7 (23,33%)	8 (26,67%)	30
AIH	4 (57,14%)	3 (42,86)	0 (0%)	7
HBV	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	10
HCV	1 (33,33%)	2 (66,67%)	0 (0%)	3
K/ <i>Control</i>	37 (35,92%)	50 (48,54%)	16 (15,53%)	103
Razem/ <i>Total</i>	83	88	36	207

4.9.2. Polimorfizmy genu *TGF-β1* a aktywność choroby u pacjentów z NZJ

U pacjentów z NZJ (także w zakresie podgrup – UC i CD) nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy częstości występowania poszczególnych genotypów dla wszystkich badanych polimorfizmów genu *TGF-β1* w zależności od aktywności choroby:

- Grupa z NZJ dla: T869C (p=0,25), G915C (p=0,27), G-800A (p=0,50) oraz C-509T (p=0,72).
- Grupa z CD dla: T869C (p=0,10), G915C (p=0,76), G-800A (p=0,93) oraz C-509T (p=0,55).
- Grupa z UC dla: T869C (p=0,35), G915C (p=0,75), G-800A (p=0,19) oraz C-509T (p=0,33).

4.9.3. Polimorfizmy genu *TGF-β1* a nasilenie reakcji immunohistochemicznej (IHC) na obecność TGF-β1

W całej obserwowanej populacji (K, NZJ, PZW) oraz w badanych grupach chorych (NZJ i PZW) nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy częstości występowania poszczególnych genotypów dla wszystkich badanych polimorfizmów genu *TGF-β1* w zależności od nasilenia reakcji immunohistochemicznej na obecność TGF-β1:

- Cała badana grupa (K, NZJ, PZW) dla: T869C (p=0,57), G915C (p=0,96), G-800A (p=0,85) oraz C-509T (p=0,34).
- Grupa z NZJ dla: T869C (p=0,63), G915C (p=0,56), G-800A (p=0,77) oraz C-509T (p=0,77).
- Grup z PZW dla: T869C (p=0,54), G915C (p=0,99), G-800A (p=0,12) oraz C-509T (p=0,54), w tej grupie chorych nie analizowano powyższej zależności w poszczególnych podgrupach chorych ze względu na bardzo małą liczebność grup pacjentów.
- Grupa z CD dla: T869C (p=0,52), G915C (p=0,25), G-800A (p=0,53) oraz C-509T (p=0,56).
- Grupa z UC dla: T869C (p=0,92), G915C (p=0,09), G-800A (p=0,40) oraz C-509T (p=0,05).

4.9.4. Występowanie poszczególnych polimorfizmów genu *TGF-β1* a stężenie TGF-β1 w osoczu

Dla całej obserwowanej populacji (K, NZJ, PZW) oraz w badanych grupach i podgrupach chorych z NZJ (CD i UC) i PZW (AIH, HBV, HCV) nie obserwowano statystycznie istotnej zależności między stężeniem TGF-β1 w osoczu a występowaniem poszczególnych genotypów dla wszystkich badanych polimorfizmów genu *TGF-β1*:

- Cała badana grupa (K,NZJ,PZW): T869C (p=0,81), G915C (p=0,2), G-800A (p=0,21), C-509T (p=0,37).
- Grupa kontrolna (K): T869C (p=0,71), G915C (p=0,82), G-800A (p=0,32), C-509T (p=0,69).

- Grupa pacjentów z PZW: T869C (p=0,60), G915C (p=0,80), G-800A (p=0,06), C-509T (p=0,49).
- Grupa pacjentów z NZJ: T869C (p=0,72), G915C (p=0,13), G-800A (p=0,54), C-509T (p=0,77).
- Grupa pacjentów z CD: T869C (p=0,14), G915C (p=0,16), G-800A (p=0,67), C-509T (p=0,15).
- Grupa pacjentów z UC: T869C (p=0,8), G915C (p=0,62), G-800A (p=0,38), C-509T (p=0,81).
- Grupa pacjentów z AIH: T869C (p=0,48), G915C (p=0,32), G-800A (p=0,12), C-509T (p=0,90).
- Grupa pacjentów z HBV: T869C (p=0,4), G-800A (p=0,38), C-509T (p=0,42). Dla polimorfizmu G915C nie wykonywano obliczeń ze względu na zbyt małą grupę chorych.
- Grupa pacjentów z HCV: G915C (p=0,90), G-800A (p=0,90), C-509T (p=0,90). Dla polimorfizmu T869C nie wykonywano obliczeń ze względu na zbyt małą grupę chorych.

4.9.5. Występowanie poszczególnych polimorfizmów genu *TGF-β1* a poziom mRNA genu *TGF-β1*

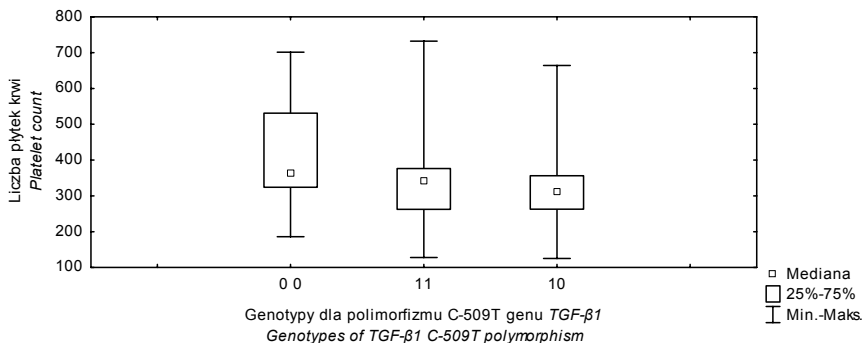
W całej analizowanej populacji (K, NZJ, PZW) oraz w badanych podgrupach chorych z NZJ (CD i UC) i PZW (AIH, HBV, HCV) nie obserwowano statystycznie istotnej zależności między poziomem mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelita i wątroby a występowaniem poszczególnych genotypów dla badanych polimorfizmów genu *TGF-β1*:

- Cała badana grupa (K, NZJ, PZW): T869C (p=0,49), G915C (p=0,88), G-800A (p=0,88), C-509T (p=0,95).
- Grupa kontrolna (K): T869C (p=0,71), G915C (p=0,82), G-800A (p=0,32), C-509T (p=0,69).
- Grupa pacjentów z PZW: T869C (p=0,80), G915C (p=0,78), G-800A (p=0,21), C-509T (p=0,64).
- Grupa pacjentów z NZJ: T869C (p=0,55), G915C (p=0,81), G-800A (p=0,45), C-509T (p=0,83).
- Grupa pacjentów z UC: T869C (p=0,78), G915C (p=0,47), G-800A (p=0,14), C-509T (p=0,80).
- Grupa pacjentów z CD: T869C (p=0,76), G915C (p=0,98), G-800A (p=0,95), C-509T (p=0,67).
- Grupa pacjentów z AIH: T869C (p=0,68), G915C (p=0,35), G-800A (p=0,35), C-509T (p=0,16).
- Grupa pacjentów z HBV: T869C (p=0,24), G-800A (p=0,13), C-509T (p=0,24). Dla polimorfizmu G915C nie wykonywano obliczeń ze względu na brak danych.
- Grupa pacjentów z HCV: G915C (p=0,22), G-800A (p=0,22), C-509T (p=0,22). Dla polimorfizmu T869C nie wykonywano obliczeń ze względu na brak danych.

4.9.6. Wybrane badania laboratoryjne a poszczególne genotypy polimorfizmów genu *TGF-β1*

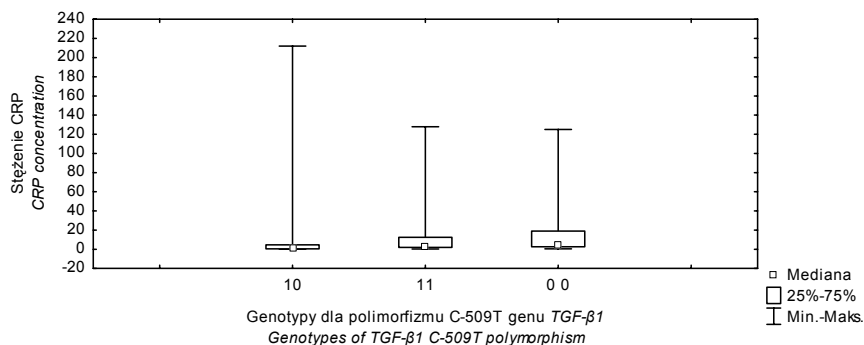
W całej obserwowanej populacji (K, NZJ, PZW) nie obserwowano statystycznie istotnej zależności między wybranymi parametrami laboratoryjnymi [(liczba krwinek białych (WBC), liczba płytek krwi (PLT), OB, stężenie: CRP, żelaza (Fe) oraz białka całkowitego (B. całk.))] a występowaniem poszczególnych genotypów dla następujących polimorfizmów genu *TGF-β1*:

- Polimorfizm T869C – dla: WBC ($p=0,67$), Fe ($p=0,50$), PLT ($p=0,07$), CRP ($p=0,15$), OB ($p=0,31$) oraz B. całk. ($p=0,21$).
- Polimorfizm G915C – dla: WBC ($p=0,46$), Fe ($p=0,78$), PLT ($p=0,80$), CRP ($p=0,61$), OB ($p=0,83$) oraz B. całk. ($p=0,88$).
- Polimorfizm G-800A – dla: WBC ($p=0,89$), Fe ($p=0,22$), PLT ($p=0,57$), CRP ($p=0,72$), OB ($p=0,62$) oraz B. całk. ($p=0,26$).
- W zakresie polimorfizmu w rejonie promotorowym w pozycji -509 stwierdzono: brak statystycznie istotnej zależności między występowaniem poszczególnych genotypów a: WBC ($p=0,45$), Fe ($p=0,56$), OB ($p=0,09$) oraz B. całk. ($p=0,14$). Wykazano natomiast statystycznie istotną zależność w zakresie liczby płytek krwi ($p=0,04$); dotyczyło to porównania homozygot z mutacją i heterozygot (wartości wyższe stwierdzano u osobników homozygotycznych wobec zmutowanego allelu – ryc. 78) oraz stężenia CRP – dotyczyło to porównań – heterozygot i homozygot dzikich (wartości wyższe w grupie homozygot dzikich, $p=0,01$) oraz heterozygot i homozygot z mutacją (wartości wyższe u homozygot z mutacją, $p=0,02$) (ryc. 79).



Ryc. 78. Liczba płytek krwi a poszczególne genotypy dla polimorfizmu C-509T genu *TGF-β1*

Fig. 78. Platelet count in relation to genotypes of *TGF-β1* C-509T polymorphism in the study group



Ryc. 79. Stężenie CRP w surowicy (mg/l) a poszczególne genotypy dla polimorfizmu C-509T genu *TGF-β1*
 Fig. 79. CRP concentration (mg/l) in relation to genotypes of *TGF-β1* C-509T polymorphism in the study group

4.10. Analiza wieloczynnikowa

Analizie poddano grupę pacjentów z NZJ, wprowadzając następujące parametry:

- zmienna zależna: aktywność choroby
- czynniki jakościowe: płeć badanych
- czynniki ciągłe: dla CD – wiek badanych, liczba krwinek białych (WBC), poziom żelaza w surowicy (Fe), hematokryt (Ht), liczbę płytek krwi (PLT), stężenie białka C-reaktywnego (CRP), stężenie *TGF-β1* w osoczu, poziom mRNA genu *TGF-β1* (badany w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych chorobowo)
- czynniki ciągłe: dla UC – wiek badanych, liczba krwinek białych (WBC), poziom żelaza w surowicy (Fe), hematokryt (Ht), liczbę płytek krwi (PLT), stężenie białka C-reaktywnego (CRP), stężenie *TGF-β1* w osoczu, poziom mRNA genu *TGF-β1* (badany w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych chorobowo), stężenie albuminy w surowicy krwi.

Wszystkie wymienione wyżej parametry podano dla 78 spośród 104 pacjentów z NZJ.

Dla tych chorych uzyskano statystycznie istotne modele regresji w trzech stosowanych metodach: standardowej, krokowo postępującej i krokowo wstecznej. Analizę przeprowadzono oddzielnie dla chorych z CD i UC.

4.10.1. Analiza wieloczynnikowa w podgrupie pacjentów z CD

W podgrupie CD (n=27) nie uzyskano statystycznie istotnego modelu regresji wieloczynnikowej, dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej, prowadzonej metodą standardową ($R^2=0,32$; $p=0,95$) (tab. 60).

W modelu regresji wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo postępującą oraz krokowo wsteczną uzyskano statystycznie istotny, niezależny związek hematokrytu z aktywnością choroby ($R^2=0,16$; $p=0,04$). Wagę obserwowanych wpływów przedstawia tabela 61.

Tab. 60. Podsumowanie analizy wieloczynnikowej prowadzonej metodą standardową w grupie pacjentów z CD, dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej

Tabl. 60. Summary of multiple regression analysis in CD patients (disease activity as dependent variable, standard method).

	Aktywność Activity t	Aktywność Activity p	-95% CI	+95% CI	Aktywność Activity BETA	Aktywność Activity BETA SE	-95%	+95%
Wyraz wolny <i>Constant value</i>	1,2154	0,25	-3,9678	13,979				
Wiek / <i>Age</i>	0,2995	0,77	-0,1410	0,1859	0,1395	0,4656	-0,8751	1,1540
WBC	-0,4965	0,63	-0,2345	0,1474	-0,1598	0,3218	-0,8611	0,5414
Fe	-0,4185	0,68	-0,0147	0,0100	-0,1431	0,3419	-0,8879	0,6018
Hct	-0,4771	0,64	-0,6129	0,3927	-0,4238	0,8883	-2,3593	1,5117
PLT	0,2150	0,83	-0,0042	0,0051	0,0787	0,3663	-0,7194	0,8768
CRP	0,7614	0,46	-0,0162	0,0336	0,3056	0,4014	-0,5689	1,1802
TGF- β 1 osocze / <i>plasma</i>	0,4415	0,67	-0,0609	0,0918	0,1444	0,3270	-0,5681	0,8569
Poziom mRNA genu TGF- β 1 <i>TGF-β1 gene mRNA level</i>	0,2793	0,78	-4,1711	5,3979	0,0858	0,3070	-0,5832	0,7547
Płeć / <i>Gender</i>	-0,3410	0,74	-0,7212	0,5259	-0,1266	0,3713	-0,9356	0,6823

Tab. 61. Podsumowanie analizy wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo postępującą i krokowo wsteczną w grupie pacjentów z CD, dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej

Tab. 61. Summary of multiple regression analysis in CD patients (disease activity as dependent variable, step-wise forward and backward methods)

	Aktywność Activity t	Aktywność Activity p	-95% CI	+95% CI	Aktywność Activity BETA	Aktywność Activity BETA SE	-95%	+95%
Wyraz wolny <i>Constant value</i>	2,7538	0,011	1,2374	8,5791				
Wiek / <i>Age</i>		Ns						
WBC		Ns						
Fe		Ns						
Hct	-2,22	0,04	-0,2032	-0,0076	-0,4058	0,1828	-0,7823	-0,0293
PLT		Ns						
CRP		Ns						
TGF- β 1 osocze / <i>plasma</i>		Ns						
Poziom mRNA genu TGF- β 1 <i>TGF-β1 gene mRNA level</i>		Ns						
Płeć / <i>Gender</i>		Ns						

4.10.2. Analiza wieloczynnikowa w podgrupie UC

W podgrupie pacjentów z UC (n=51) w analizie wieloczynnikowej prowadzonej metodą standardową uzyskano statystycznie istotny model regresji dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej ($R^2=0,55$; $p=0,002$) nie wskazujący jednakże na żaden parametr niezależny (tab. 62), w metodzie krokowo postępującej uzyskano statystycznie istotny model regresji ($R^2=0,40$; $p<0,001$) wskazujący na niezależny związek stężenia CRP z aktywnością choroby (tab. 64). Wagę obserwowanych wpływów przedstawia tabela numer 63. Analiza przeprowadzona w tej grupie chorych metodą krokowo wsteczną wykazała statystycznie istotny model regresji ($R^2=0,45$; $p<0,0001$). Obserwowano statystycznie istotny, niezależny związek poziomu żelaza i CRP oraz wartości hematokrytu z aktywnością choroby. Wagę obserwowanych wpływów przedstawia tabela numer 64.

Tab. 62. Podsumowanie analizy wieloczynnikowej prowadzonej metodą standardową w grupie pacjentów z UC, dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej.

Tabl. 62. Summary of multiple regression analysis in UC patients (disease activity as dependent variable, standard method).

	Aktywność Activity t	Aktywność Activity p	-95% CI	+95% CI	Aktywność Activity BETA	Aktywność Activity BETA SE	-95%	+95%
Wyraz wolny <i>Constant value</i>	2,3687	0,02	0,4779	6,1684				
Wiek / <i>Age</i>	0,2290	0,82	-0,0607	0,0762	0,0452	0,1974	-0,3551	0,4455
WBC	0,8880	0,38	-0,0383	0,0979	0,1543	0,1738	-0,1982	0,5068
Fe	-1,4549	0,15	-0,0082	0,0013	-0,2129	0,1463	-0,5097	0,0839
Hct	-0,5614	0,58	-0,2069	0,1172	-0,3457	0,6157	-1,5945	0,9031
PLT	-0,9239	0,36	-0,0037	0,0014	-0,1672	0,1810	-0,5342	0,1998
CRP	0,6776	0,50	-0,0036	0,0071	0,0964	0,1423	-0,1921	0,3849
TGF-β1 osocze / <i>plasma</i>	0,7359	0,46	-0,0119	0,0254	0,0991	0,1346	-0,1740	0,3721
Poziom mRNA genu TGF-β1 <i>TGF-β1 gene mRNA level</i>	-0,1697	0,87	-1,2363	1,0454	-0,0211	0,1245	-0,2736	0,2313
Albumina <i>Albumin</i>	0,3351	0,74	-0,0410	0,0572	0,0519	0,1548	-0,2621	0,3659
Płeć / <i>Gender</i>	0,4069	0,69	-0,1608	0,2415	0,0549	0,1349	-0,2187	0,3285

Tab. 63. Podsumowanie analizy wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo postępującą w grupie pacjentów z UC, dla aktywności choroby jako zmiennej zależnej

Tabl. 63. Summary of multiple regression analysis in UC patients (disease activity as dependent variable, stepwise forward method)

	Aktywność <i>Activity</i> t	Aktywność <i>Activity</i> p	-95% CI	+95% CI	Aktywność <i>Activity</i> BETA	Aktywność <i>Activity</i> BETA SE	-95%	+95%
Wyraz wolny <i>Constant value</i>	7,2156	<0,001	2,9163	5,1712				
Wiek / <i>Age</i>		Ns						
WBC		Ns						
Fe		Ns						
Hct								
PLT		Ns						
CRP	2,1710	0,0350	0,0003	0,0087	0,2459	0,1133	0,0180	0,4739
TGF-β1 <i>osocze / plasma</i>		Ns						
Poziom mRNA genu TGF-β1 <i>TGF-β1 gene mRNA level</i>		Ns						
Albumina <i>Albumin</i>		Ns						
Płeć / <i>Gender</i>		Ns						

Tab. 64. Podsumowanie analizy wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo wsteczną w grupie pacjentów z UC

Tab. 64. Summary of multiple regression analysis in UC patients (disease activity as dependent variable, backward stepwise method)

	Aktywność Activity t	Aktywność Activity p	-95% CI	+95% CI	Aktywność Activity BETA	Aktywność Activity BETA SE	-95%	+95%
Wyraz wolny <i>Constant value</i>	6,3599	<0,001	2,4788	4,7726				
Wiek / <i>Age</i>		Ns						
WBC		Ns						
Fe	-2,5357	0,0146	-0,0083	-0,0010	-0,2903	0,1145	-0,5207	-0,0600
Hct	-3,4110	0,0014	-0,0818	-0,0211	-0,3967	0,1163	-0,6307	-0,1627
PLT		Ns						
CRP	2,3009	0,0259	0,0006	0,0089	0,2567	0,1115	0,0323	0,4811
TGF- β 1 osocze / <i>plasma</i>		Ns						
Poziom mRNA genu TGF- β 1 <i>TGF-β1 gene mRNA level</i>		Ns						
Albumina / <i>Albumin</i>		Ns						
Płeć / <i>Gender</i>		Ns						

5. Podsumowanie wyników badań

I Charakterystyka badanych

1. Analizie poddano 167 pacjentów, w tym 97 chłopców (58,1%) oraz 70 dziewcząt (41,9%). Wiek badanych wahał się od 1,5 do 18,4 lat (średni wiek $12,5 \pm 4,5$; mediana 14,0 lat). W grupie kontrolnej (K) były 42 osoby (25,1%), w grupie chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit (NZJ) – 104 pacjentów (62,3%) (UC – 68, CD – 36), zaś w grupie dzieci z przewlekłymi zapaleniami wątroby (PZW) – 21 pacjentów (12,6%).
2. Stan odżywienia w grupie chorych z NZJ: współczynnik BMI nie różnił się między chorymi z UC i CD, **natomiast wartość współczynnika Cole'a była wyższa w grupie pacjentów z UC ($p < 0,05$).**
3. W analizie objawów klinicznych u pacjentów z NZJ wykazano, że obecność krwi w stolcu **znamiennie częściej stwierdzano u chorych z UC w porównaniu z pacjentami z CD ($p = 0,01$).**
4. Analiza wyników parametrów laboratoryjnych w badanych grupach dzieci wykazała u pacjentów z NZJ w porównaniu z grupą kontrolną: **znamiennie wyższą liczbę białych krwinek i granulocytów obojętnochłonnych w badaniu morfotycznym krwi oraz wyższe stężenie CRP i wartości OB.** W tej grupie chorych stwierdzono również **niższe stężenie hemoglobiny, albuminy oraz żelaza we krwi.** Natomiast wartości OB różniły się statystycznie istotnie nie tylko w porównaniu z grupą kontrolną, ale również między pacjentami z CD i UC i były **znamiennie statystycznie wyższe u dzieci z CD.**

II Stężenie TGF- β 1 w osoczu

1. Nie wykazano istotnej statystycznie zależności stężenia TGF- β 1 w osoczu od wieku i płci w całej badanej populacji dzieci (także w grupie kontrolnej analizowanej oddzielnie).
2. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy stężenia TGF- β 1 w osoczu między badanymi grupami (K, PZW, NZJ) ani podgrupami chorych (UC, CD, AIH, HBV, HCV).
3. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy stężenia TGF- β 1 w osoczu między pacjentami z NZJ w różnych fazach choroby (początek, remisja, nawrót).
4. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy stężeń TGF- β 1 w osoczu w zależności od stopnia aktywności choroby u pacjentów z NZJ oraz w analizowanych podgrupach chorych (CD i UC) i w porównaniu z grupą kontrolną.
5. Nie wykazano korelacji między stężeniem TGF- β 1 w osoczu a stanem odżywienia pacjentów z NZJ określonym przez BMI oraz współczynnik Cole'a.
6. Zależność poziomu TGF- β 1 w osoczu i wybranych parametrów biochemicznych:
 - W grupie kontrolnej **wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między aktywnością GGTP i stężeniem TGF- β 1 w osoczu.**

- W grupie chorych PZW **stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację aktywności GGTP i stężenia TGF- β 1 w osoczu oraz ujemną odsetka leukocytów kwasochłonnych w morfologii krwi obwodowej i stężenia TGF- β 1 w osoczu.**
 - W grupie pacjentów z NZJ nie obserwowano żadnych statystycznie istotnych korelacji.
7. Ocena stężenia TGF- β 1 w osoczu badana u tych samych chorych z NZJ w okresie aktywnym choroby i w remisji
- Stężenie TGF- β 1 w osoczu było **znamiennie wyższe w aktywnej fazie choroby w porównaniu z wynikami uzyskanymi w czasie remisji ($p=0,005$).**
 - Stężenie TGF- β 1 w osoczu badane w aktywnym okresie choroby było także **znamiennie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,03$).**
 - Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie między stężeniem TGF- β 1 w osoczu mierzonym w okresie remisji u pacjentów z NZJ a wartościami uzyskanymi w grupie kontrolnej.

III Poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w bioptatach błony śluzowej jelita i wycinkach wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

1. Chorzy z NZJ

a. Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit:

- Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 badany w aktywnym okresie choroby w wycinkach błony śluzowej jelit ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako zmienione chorobowo był **znamiennie wyższy niż w grupie kontrolnej (dla całej grupy NZJ – $p=0,002$, dla pacjentów z UC - $p=0,02$, dla chorych z CD na granicy zmienności $p=0,05$).** Nie stwierdzono istotnych różnic między podgrupami chorych z UC i CD.
- Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 między grupą kontrolną a chorymi z NZJ (także w obrębie podgrup chorych z UC i CD), gdy wycinki błony śluzowej jelit zostały pobrane w aktywnym okresie choroby, ale z obszaru ocenionego w badaniu kolonoskopowym jako niezmienny chorobowo ($p=0,12$).
- Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 badany w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych w aktywnym okresie choroby z obszaru ocenionego w badaniu kolonoskopowym jako zmieniony chorobowo był **znamiennie wyższy niż uzyskany z miejsc ocenionych jako niezmienny (oznaczenia wykonano jednocześnie u tych samych chorych – dla całej grupy chorych z NZJ oraz oddzielnie dla pacjentów z UC i CD – $p=0,001$).** Nie stwierdzono istotnych różnic między podgrupami chorych z UC i CD.
- Wykazano istotną statystycznie różnicę poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit uzyskanych w różnych okresach choroby. **Wyższe wartości stwierdzono w okresie nawrotu choroby w porównaniu z wartościami mierzonymi w grupie kontrolnej i u chorych**

z NZJ w okresie remisji (nawrót vs. grupa kontrolna $p=0,04$, nawrót vs. remisja u chorych z NZJ $p=0,01$).

- Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF β 1 w zależności od stopnia aktywności choroby oraz w porównaniu z grupą kontrolną dla całej grupy pacjentów z NZJ oraz w analizowanych podgrupach chorych (CD i UC).
- b. Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit oceniany u tych samych chorych z NZJ dwukrotnie: w okresie aktywnym choroby oraz w czasie remisji
- Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 oznaczany w aktywnym okresie choroby w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z obszarów ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako zmienione chorobowo był **znamiennie wyższy niż badany u tych samych chorych w czasie remisji choroby ($p=0,004$).**
 - Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 oznaczany w aktywnym okresie choroby w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z obszarów ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako niezmiennione chorobowo był **również znamiennie wyższy niż badany u tych samych chorych w czasie remisji choroby ($p=0,04$).**
 - Poziom mRNA genu *TGF- β 1* oznaczany w aktywnym okresie choroby w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z obszarów ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako zmienione chorobowo był **znamiennie wyższy niż grupie kontrolnej ($p=0,03$).**
 - Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 między wynikami uzyskanymi w aktywnym okresie choroby w wycinkach pobranych z obszarów ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako niezmiennione chorobowo i w grupie kontrolnej ($p=0,74$).
 - Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 między wynikami uzyskanymi w okresie remisji choroby i w grupie kontrolnej ($p=0,05$).
2. Pacjenci z PZW
- Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach wątroby między grupą kontrolną a chorymi z PZW, także w obrębie badanych podgrup chorych – AIH, HBV, HCV.

IV Poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 a wyniki badań laboratoryjnych

1. W grupie kontrolnej nie obserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności między poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 a badanymi parametrami biochemicznymi.
2. Dla całej grupy chorych z NZJ oraz w podgrupie pacjentów z UC poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 badany w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych z obszaru ocenionego jako zmieniony chorobowo w badaniu kolonoskopowym **korelował ujemnie ze stężeniem żelaza w surowicy krwi**

(dla NZJ $p=0,03$ dla UC $p=0,04$), natomiast dla chorych z CD nie stwierdzono podobnej korelacji.

3. Dla całej grupy chorych z PZW obserwowano istotną statystycznie **dodatnią korelację między poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 a aktywnością ALT w surowicy ($p=0,03$) i wartością OB ($p=0,002$).**

V Wynik badania immunohistochemicznego (IHC) na obecność TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby w analizowanych grupach i podgrupach dzieci

1. U pacjentów z PZW wykazano **mniejsze nasilenie reakcji IHC w porównaniu z innymi badanymi grupami (NZJ i K, $p=0,04$).**
2. W całej grupie pacjentów z NZJ oraz oddzielnie dla chorych z CD i UC nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy nasilenia reakcji IHC w zależności od aktywności ani fazy choroby.

VI Stężenie TGF- β 1 w osoczu, poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 oraz nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 a aktywność zapalna (grading) i włóknienie (staging) w wycinkach wątroby u pacjentów z PZW

- Dla całej grupy chorych z PZW nie wykazano istotnych statystycznie zależności w zakresie wszystkich analizowanych parametrów. Nie przeprowadzono oddzielnej analizy dla poszczególnych podgrup chorych (AIH, HBV, HCV) ze względu na ich małą liczebność.

VII Stężenie TGF- β 1 w osoczu, poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1, nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 a wynik badania kolonoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ

- Dla całej grupy chorych z NZJ oraz w podgrupach UC i CD nie wykazano istotnych statystycznie zależności w zakresie analizowanych parametrów.

VIII Analiza badanych polimorfizmów dla genu *TGF- β 1* (T869C, G915C, G-800A, C-509T).

1. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między poszczególnymi genotypami (homozygota dzika, heterozygota, homozygota z mutacją) badanych polimorfizmów a:
 - występowaniem analizowanych schorzeń,
 - ich przebiegiem klinicznym,
 - stężeniem TGF- β 1 w osoczu,
 - poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 ocenianym w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby,
 - nasileniem reakcji immunohistochemicznej (IHC) na obecność TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby.
2. Badane polimorfizmy dla genu *TGF- β 1* (T869C, G915C, G-800A, C-509T) a wybrane badania laboratoryjne (liczba krwinek białych i płytek

krwi, poziom hemoglobiny, CRP, białka całkowitego, albuminy i żelaza w surowicy oraz wartość OB).

- Dla polimorfizmów T869C, G915C, G-800A nie wykazano żadnych zależności w zakresie analizowanych parametrów.
- Jedynie dla polimorfizmu w rejonie promotorowym C-509T wykazano: **statystycznie istotną zależność w zakresie liczby płytek krwi (dotyczyło to porównania homozygot z mutacją i heterozygot – $p=0,04$, wartości wyższe stwierdzano u osobników homozygotycznych wobec zmutowanego allelu) oraz stężenia CRP (dotyczyło to porównań – heterozygot i homozygot dzikich – $p=0,01$, wartości wyższe w grupie homozygot dzikich oraz heterozygot i homozygot z mutacją – $p=0,02$, wartości wyższe u homozygot z mutacją).**

IX Analiza wieloczynnikowa u pacjentów z NZJ: Wprowadzono następujące parametry: zmienna zależna – aktywność choroby, czynniki jakościowe – płeć badanych oraz czynniki ciągłe:

- dla CD – wiek badanych, liczba krwinek białych (L), poziom żelaza w surowicy (Fe), hematokryt (Ht), liczbę płytek krwi (PLT), stężenie białka C-reaktywnego (CRP), stężenie TGF- β 1 w osoczu, poziom mRNA genu *TGF- β 1* (badany w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych chorobowo)
 - dla UC – wiek badanych, liczba krwinek białych (L), poziom żelaza w surowicy (Fe), hematokryt (Ht), liczbę płytek krwi (PLT), stężenie białka C-reaktywnego (CRP), stężenie TGF- β 1 w osoczu, poziom mRNA genu *TGF- β 1* (badany w wycinkach błony śluzowej jelit makroskopowo zmienionych chorobowo), stężenie albuminy w surowicy krwi.
1. W grupie chorych z CD w modelu regresji wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo postępującą i krokowo wsteczną **uzyskano statystycznie istotny model regresji wykazując statystycznie istotny, niezależny związek wartości hematokrytu z aktywnością choroby.**
 2. W grupie chorych z UC w modelu regresji wieloczynnikowej prowadzonej metodą krokowo postępującą **uzyskano statystycznie istotny model regresji wykazując statystycznie istotny, niezależny związek białka C-reaktywnego z aktywnością choroby.** Natomiast w analizie metodą krokowo wsteczną stwierdzono **statystycznie istotny model regresji obserwując niezależny związek poziomu żelaza i białka C-reaktywnego w surowicy krwi oraz hematokrytu z aktywnością choroby.**

6. Omówienie wyników i dyskusja

6.1. Wprowadzenie

Obecnie, wobec stałego postępu w zakresie diagnostyki, terapii, a także profilaktyki wielu schorzeń zapalnych, coraz mniejszy problem stanowią procesy ostre. W dalszym ciągu jednak przewlekłe stany zapalne niosą za sobą poważne trudności zarówno diagnostyczne, lecznicze, jak i prognostyczne.

Wynika to przede wszystkim z faktu nadal nie w pełni wyjaśnionej etiologii szeregu z tych schorzeń [27, 90, 96, 97, 151]. Szczególne problemy stanowią choroby, w których bierze się pod uwagę wiele czynników etiopatofizjologicznych: genetycznych, infekcyjnych, środowiskowych, jatrogennych, a przede wszystkim immunologicznych [20, 27, 151, 169, 237].

W wieku rozwojowym, czyli w okresie dynamicznych zmian także w zakresie dojrzewania procesów odpornościowych, zagadnienie to stanowi szczególnie poważny problem. Wśród przewlekłych stanów zapalnych stosunkowo często spotykanych w tym wieku wymienia się schorzenia układu pokarmowego, w tym przede wszystkim nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) i przewlekłe zapalenia wątroby (PZW) zarówno o podłożu infekcyjnym, jak i immunologicznym.

Etiologia i patogenezą NZJ nadal budzi szereg wątpliwości. Mimo że schorzenia powyższe zostały opisane w ubiegłych stuleciach (UC w roku 1859 – Walks, CD w roku 1932 – Crohn, Ginsberg, Leśniowski i Oppenheimer) w dalszym ciągu nie jest znana bezpośrednia przyczyna bądź przyczyny odpowiedzialne za ujawnienie się tych chorób [20]. Na przestrzeni lat wielokrotnie powracało pytanie, czy wrzodzące zapalenie jelita grubego (UC) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (CD) należy traktować jako dwie różne choroby o podobnej symptomatologii czy też jako jedno schorzenie cechujące się polimorfizmem: lokalizacyjnym, nasilenia zmian histologicznych oraz geograficznym [27, 90, 236]. Jednak najnowsze badania genetyczne (układ HLA, mutacja genu NOD2, polimorfizm genów kodujących pewne cytokiny) oraz immunologiczne (obecność autoprzeciwciał, różna ekspresja limfocytów Th1 i Th2, udział poszczególnych cytokin w patogenezie) pozwalają na stwierdzenie z dużym prawdopodobieństwem, że mamy do czynienia z dwoma odrębnymi jednostkami chorobowymi o podobnej symptomatologii klinicznej [20].

Obecnie uważa się, że niektóre z branych pod uwagę w przeszłości czynników, nie są ściśle patogenetycznie związane z NZJ lub odgrywają jedynie dodatkową rolę. Wykluczono bezpośredni przyczynowy związek szeregu zakażeń przewodu pokarmowego, dających podobny jak w przebiegu NZJ obraz kliniczny, laboratoryjny i często histologiczny. Wykazano bowiem, że celowane leczenie przeciwbakteryjne było w tych przypadkach efektywne i prowadziło do ustąpienia objawów klinicznych oraz zmian histologicznych w śluzówce jelita [172]. Duże nadzieje dotyczące etiologii wiązano ze współistnieniem u chorych z CD zakażenia *Mycobacterium paratuberculosis*. Drobnoustrój ten był bowiem izolowany z ponad 50% biopłatów jelit pacjentów z CD, podczas

gdy stwierdzano go jedynie u 20% z grupy kontrolnej i chorych z UC. Jednak terapia przeciwpłatkowa nie przyniosła oczekiwanych efektów [176, 243].

Hipoteza etiologii infekcyjnej w NZJ okresowo powraca, zwłaszcza gdy udowodniono ewidentny związek zakażenia wywołanego przez *Helicobacter pylori* z zapaleniem błony śluzowej żołądka [21, 188]. Wydaje się jednak, że zakażenie spełnia ewentualnie rolę czynnika dodatkowego, a podstawowe zaburzenia dotyczą jednak regulacji procesów immunologicznych w obrębie jelit. Zasadniczą rolę, jak wspomniano, odgrywają tu cytokiny produkowane przez limfocyty (głównie limfocyty T o fenotypie Th1 i Th2), monocyty, makrofagi, granulocyty, komórki śród- i nabłonkowe oraz fibroblasty [208]. Według aktualnych badań wydaje się, że kluczowe znaczenie w ujawnieniu się NZJ odgrywa brak równowagi między odpowiedzią typu Th1 i Th2 [244]. Następstwem tego jest zachwianie dynamicznej równowagi w sekrecji cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ) i przeciwzapalnych (antagonista receptora dla IL-1 – IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) oraz transformującego czynnika wzrostu beta – TGF- β [20, 118, 208, 244].

Szereg doniesień wskazuje na to, że prawidłowy stosunek antagonisty dla endogennego receptora IL-1 (IL-1ra) i IL-1 odgrywa ważną rolę w patogenezie NZJ [20, 32, 208]. *Ferretti i wsp.* wykazali, że zablokowanie IL-1ra prowadziło do przewlekania i nasilania się zapalenia jelit u królików [56]. Również *Melani i wsp.* obserwowali, że pozbawienie myszy IL-1ra skutkowało podobnymi objawami [167].

Wobec niewątpliwego zaangażowania cytokin w patogenezie NZJ, prowadzone są badania mające na celu z jednej strony ocenę ich poziomu we krwi i ekspresji w zmienionych chorobowo tkankach (zarówno metodami immunohistochemicznymi, jak i biologii molekularnej), a z drugiej strony poszukiwanie ewentualnej zależności częstości występowania oraz przebiegu klinicznego przewlekłych stanów zapalnych układu pokarmowego z polimorfizmem genów kodujących niektóre cytokiny [62, 69, 88, 104, 135, 136, 157, 247, 270, 271, 282]. Analizie poddaje się nie tylko same cytokiny, ale również poszczególne elementy biorące udział w prawidłowym przekazywaniu sygnału do odpowiednich elementów odbiorczych [82, 83, 173]. Najwięcej doniesień dotyczy oznaczania poziomu cytokin we krwi, co wynika przede wszystkim z mniej inwazyjnego charakteru pozyskiwania materiału biologicznego w porównaniu z oceną w tkance, oraz powszechnie dostępnej i tańszej metodologii (np. metoda ELISA). Prace koncentrują się głównie wokół najlepiej poznanych cytokin: TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1, IL-2 czy IL-12 [32, 104, 173, 194, 270, 282]. *Kader i wsp.* u chorych z NZJ jednocześnie oceniali w surowicy stężenie ponad 70 cytokin, czynników wzrostu oraz ich rozpuszczalnych receptorów [104]. Wykazano, że pewne polimorfizmy genów kodujących IL-1 bądź IL-1ra były częściej reprezentowane u chorych z NZJ w porównaniu z grupą kontrolną [20]. Obserwacje dotyczące powyższych zagadnień nie są jednak jednoznaczne [123].

Również badania dotyczące polimorfizmów genu kodującego TNF- α nie dały jednoznacznych wyników. Najwięcej danych dotyczy polimorfizmu w pozycji –308. Część autorów znajdowała zależność między występowaniem UC a wspomnianym polimorfizmem, nie obserwując podobnej korelacji dla CD. Wykazano natomiast zależność aktywności choroby oraz nasilenia procesu zapalnego zarówno w przypadku CD, jak i UC od powyższego polimorfizmu genu kodującego TNF- α [244]. *Celik i wsp.* analizując polimorfizmy genów

kodujących TNF- α , IL-1, IL-1ra oraz IL-10 u 190 chorych z NZJ nie wykazali związku między ich obecnością a zwiększonym ryzykiem wystąpienia tych schorzeń [32]. Podobne spostrzeżenia poczynili *Cantor i wsp.* w grupie prawie 200 chorych z NZJ, badając polimorfizmy genów kodujących: TNF- α , IL-10, IL-6 oraz IFN- γ [29].

Poszukiwania podobnych zależności prowadzone były także u pacjentów z przewlekłymi zapaleniami wątroby głównie o etiologii wirusowej. Analizowano nie tylko profil cytokinowy tych chorych, ale również ewentualną zależność przede wszystkim przebiegu klinicznego oraz występujących powikłań od pewnych polimorfizmów genów kodujących badane cytokiny. *Migita i wsp.* w populacji japońskiej nie wykazali korelacji między badanymi polimorfizmami dla TNF- α , IL-10 czy IL-6 a niebezpieczeństwem rozwoju raka wątrobowokomórkowego u chorych zakażonych HBV [170]. Badania *Ben-Ari i wsp.* w grupie 36 pacjentów wykazały natomiast zależność między polimorfizmem w rejonie promotorowym genu kodującego IFN- γ a wczesnym nawrotem zakażenia HCV po transplantacji wątroby. Obserwacje powyższe dostarczają istotnych wskazówek na temat ewentualnego postępowania terapeutycznego przed wykonaniem przeszczepu wątroby [16].

Niektóre dane podkreślają różnice etniczne w występowaniu polimorfizmów genów kodujących pewne cytokiny u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby [242, 265, 266, 282].

Wobec licznych rozbieżności dotyczących patogenezy i udziału w niej różnych czynników nadal konieczne są dalsze, wszechstronne badania dotyczące powyższej tematyki.

Wśród czynników biorących udział w utrzymaniu homeostazy immunologicznej ustroju wymienia się także transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) a zwłaszcza jego izoformę TGF- β 1 [111, 140, 147].

Znaczenie oraz nadzieje związane z możliwością wykorzystania TGF- β 1 w monitorowaniu przebiegu przewlekłych procesów zapalnych wynikają przede wszystkim ze zróżnicowanego i plejotropowego działania zarówno miejscowego, jak i ogólnoustrojowego [140]. Podstawowa funkcja TGF- β 1 w ustroju polega na stymulowaniu procesów proliferacji i różnicowania komórek, co skutkuje jego udziałem w regeneracji uszkodzonych tkanek. Poprzez pobudzenie produkcji składników macierzy pozakomórkowej (ECM), zwłaszcza fibronektyny, kolagenu i proteoglikanów, może prowadzić do zwłóknienia, szczególnie w przebiegu przewlekłych stanów zapalnych [19, 62, 113, 140, 234].

Biorąc udział w naprawie uszkodzonej błony śluzowej jelita przede wszystkim poprzez pobudzenie komórek nabłonka do migracji z miejsc sąsiadujących, TGF- β wpływa na przyspieszenie procesu gojenia. W wątrobie natomiast stymuluje m.in. transformację komórek gwiaździstych do miofibroblastów [50, 62, 263]. Z drugiej strony TGF- β ma bardzo silne działanie immunosupresyjne porównywalne z cyklosporyną A [72, 140]. Hamuje proliferację limfocytów typu B oraz produkcję przez nie immunoglobulin klasy G i M [111]. Natomiast poprzez zaburzenie produkcji IL-12 przez makrofagi, TGF- β ogranicza odpowiedź typu komórkowego (Th1) [248].

To tak zróżnicowane działanie TGF- β zarówno miejscowe, jak i ogólnoustrojowe, stało się bodźcem do podejmowania badań również nad jego udziałem w etiopatolo-

genezie i przebiegu NZJ oraz PZW [271]. Dane z piśmiennictwa dotyczą przede wszystkim ludzi dorosłych i nie obejmują zwykle kompleksowej analizy TGF- β [1, 7, 14, 29, 45, 104, 157, 182, 212, 266, 271].

Wobec tego w niniejszych badaniach podjęto próbę wszechstronnej oceny TGF- β 1 u dzieci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit i przewlekłymi zapaleniami wątroby. W celu realizacji powyższych założeń oceniano: poziom TGF- β 1 w osoczu, obecność TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelita oraz wątroby metodą immunohistochemiczną, obecność i poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w biopsjach błony śluzowej jelita i wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Analizowano ponadto ewentualny wpływ 4 spośród 8 znanych polimorfizmów dla genu kodującego TGF- β na częstość występowania, przebieg oraz wyniki badań dodatkowych w powyższych grupach dzieci.

6.2. Charakterystyka grupy badanej

Badaniami objęto 125 dzieci z przewlekłym stanem zapalnym układu pokarmowego, w tym 104 z nieswoistymi zapaleniami jelit (68 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i 36 z chorobą Leśniowskiego-Crohna) oraz 21 z przewlekłym zapaleniem wątroby (10 z przewlekłym HBV, 7 z AIH i 4 z HCV).

Na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego oraz przeprowadzonych badań dodatkowych (laboratoryjnych, endoskopowych oraz histologicznych) wydaje się, że analizowana grupa pacjentów z NZJ była reprezentatywna. Średni wiek w chwili badania wynosił $13,0 \pm 4,5$ lat. W badanej grupie oraz podgrupach chorych przeważała płeć męska. Większość stanowili pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, stosunek liczby chorych z UC do liczby dzieci z CD wynosił 1,9:1. Dane powyższe zgodne są z doniesieniami z piśmiennictwa [20]. Podobnie jak podają inni autorzy, wśród objawów klinicznych obserwowanych w przedstawianej grupie pacjentów, obecność krwi w stolcu znamienne częściej stwierdzano u chorych z CU [94]. Natomiast stan odżywienia badanych dzieci z NZJ oceniany przy pomocy współczynnika Cole'a był wyższy w grupie CU, co koresponduje z wynikami innych obserwacji [214].

W badanej grupie chorych z NZJ oceniane parametry stanu zapalnego (OB, CRP, liczba krwinek białych i płytek krwi, odsetek granulocytów w badaniu morfotycznym krwi) były znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej. Wydaje się, że wśród markerów monitorujących stan zapalny najistotniejszą rolę odrywa białko C-reaktywne (CRP). Ma ono krótki okres półtrwania, jego poziom narasta szybko wraz z nasilaniem się procesu zapalnego i równie szybko obniża się w fazie zdrowienia. Ponadto oznaczanie poziomu białka C-reaktywnego jest badaniem tanim, łatwym w wykonaniu i, co bardzo istotne, powszechnie dostępnym. *Gisbert i wsp.* przedstawili wyniki sugerujące, że szczególnie w przypadku CD poziom CRP dobrze koreluje ze stopniem aktywności choroby [70, 232, 283]. Również w niniejszej pracy wykazano, że znamienne wyższe wartości CRP stwierdzano właśnie w tej grupie badanych.

Inny wskaźnik nasilenia procesu zapalnego, jakim jest czas opadania krwinek czerwonych (OB), może być także wykorzystywany do monitorowania przebiegu NZJ.

W analizowanej grupie dzieci stwierdzono znamienne wyższe wartości tego parametru w obu grupach pacjentów z NZJ (aczkolwiek wartości zdecydowanie wyższe wykazano w grupie CD) w porównaniu z grupą kontrolną. W związku z tym wydaje się, że jako parametr różnicujący CD i UC ma on mniejszą wartość niż CRP. Należy także pamiętać, że OB pomimo wielu zalet (łatwość oznaczania, powszechna dostępność i niski koszt) ma jednak pewne wady. Jego wartości zależą m.in.: od wieku badanych, współistniejącej niedokrwistości czy stosowanych używek (np. tytoń). Powszechne zastosowanie go jako markera aktywności procesu zapalnego jest ograniczone również ze względu na to, że zmiany jego wartości są zdecydowanie mniej dynamiczne niż w przypadku innych parametrów. Wykazano ponadto, że niektóre leki mogą zmieniać wartości OB. Jest to szczególnie niekorzystne w przypadku azathiopryny, leku powszechnie stosowanego w terapii NZJ [10].

Wśród innych badań dodatkowych wykonanych u dzieci z NZJ, wykazano znamienne niższy poziom żelaza w surowicy krwi w obu podgrupach badanych. Zawartość żelaza w surowicy krwi nie różniła się istotnie między dziećmi z UC i CD, mimo że u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego znamienne częściej obserwowano krew w stolcu.

Grupa pacjentów z przewlekłymi zapaleniami wątroby (PZW) była zdecydowanie mniej liczna. Jednak wobec pojedynczych doniesień w piśmiennictwie na temat zachowania się TGF- β 1 u dzieci z przewlekłymi schorzeniami wątroby, nie zrezygnowano z zaprezentowania wyników uzyskanych także w tej grupie. Wśród pacjentów z PZW najczęściej było dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, najmłodszy pacjent w tej grupie miał 11 lat i był znacznie starszy niż najmłodszy pacjent z AIH bądź HCV. Jest to oczywistą konsekwencją wprowadzenia w drugiej połowie lat 90-tych ubiegłego wieku w całej Polsce, do obowiązującego kalendarza szczepień, także szczepienia przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.

Drugą pod względem liczebności podgrupą wśród pacjentów z PZW były dzieci z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby. Jak wspomniano, obecnie w związku z podejmowanymi wielokierunkowymi działaniami zmniejszającymi narażenie na zakażenie wirusami hepatotropowymi, wzrasta odsetek dzieci z tym rozpoznaniem.

6.3. Transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1) oraz inne wybrane cytokiny w przewlekłych zapaleniach wątroby

W związku z tym, że TGF- β 1 bierze niewątpliwie udział w tworzeniu macierzy pozakomórkowej (ECM – extracellular matrix) oraz aktywnie uczestniczy w procesach naprawczych, interesująca wydaje się ocena poziomu tej cytokiny u pacjentów z przewlekłymi zapaleniami wątroby, w przebiegu których, jak wiadomo, może dojść do rozwoju marskości wątroby [164]. Najwięcej danych z piśmiennictwa dotyczy zachowania się TGF- β 1 u pacjentów z przewlekłymi wirusowymi zapaleniami wątroby typu C i B [31, 59, 79, 98, 110, 115, 117, 134, 242, 266]. Zdecydowana większość doniesień podkreśla znamienne wyższy poziom TGF- β 1 w osoczu u tych chorych w porównaniu z grupą kontrolną [59, 117, 156, 163].

Część autorów obserwowała także spadek poziomu tej cytokiny we krwi u chorych, którzy pozytywnie odpowiedzieli na terapię przeciwwirusową [163]. *Tsushima i wsp.* w grupie 43 pacjentów z PZW typu C przed rozpoczęciem leczenia IFN- α stwierdzili znamienne wyższe poziomy TGF- β 1 w porównaniu z grupą kontrolną. Retrospektywnie wykazali także, że stężenie TGF- β 1 w osoczu badane w chwili zakończenia terapii różniło się znamienne w zależności od ostatecznego wyniku leczenia. W grupie chorych, u których uzyskano długotrwałą, pozytywną odpowiedź na leczenie, stężenie badanej cytokiny było znamienne niższe niż u pacjentów, którzy nie wyeliminowali HCV bądź u których doszło do nawrotu choroby. [260]. *Janczewska-Kazek i wsp.* wykazali znamienne spadek poziomu TGF- β 1 w osoczu po zakończeniu terapii skojarzonej IFN- α i ribawiryną, niezależnie od wyniku leczenia [98]. Obniżenie się poziomu TGF- β 1 w osoczu także u pacjentów, u których nie doszło do eliminacji HCV, daje nadzieje na ograniczenie, również u nich, procesu włóknienia wątroby [31].

Podobnie u chorych z PZW typu B większość autorów obserwowała wyższy poziom tej cytokiny w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną. *Flisiak i wsp.* stwierdzili spadek jej stężenia w początkowym okresie leczenia lamiwudyną, nie wykazując utrzymania się tego efektu po zakończeniu terapii. Odległa obserwacja tej grupy chorych (w 72 tyg.) wykazała jednak znamienne niższy wyjściowy poziom TGF- β 1 u tych pacjentów, którzy w przyszłości pozytywnie odpowiedzieli na terapię przeciwwirusową [59]. *Murawaki i wsp.* stwierdzili natomiast, że podwyższenie poziomu TGF- β 1 w surowicy występuje u chorych z PZW jedynie w przypadku nasilonych zmian histologicznych (aktywność zapalna i włóknienie), nie widząc podobnej zależności w przypadku zmian minimalnych [182]. Szereg doniesień podkreśla wyraźny związek osoczkowego poziomu TGF- β 1 z nasileniem włóknienia w wątrobie [59, 61, 98, 110, 182, 185, 193, 260]. Badacze tureccy, u 30 chorych z PZW typu B, oceniając aktywność w osoczu IL-4, TNF- α , INF- γ oraz TGF- β 1, wykazali znamienne wyższy poziom wszystkich badanych cytokin niż w grupie kontrolnej, ale jedynie poziom TGF- β 1 korelował dodatnio z nasileniem włóknienia w wątrobie [1]. Natomiast *Marek i wsp.*, na podstawie przeprowadzonych badań w grupie 75 chorych z PZW o etiologii wirusowej, wysunęli wniosek, że poziom TGF- β 1 w osoczu dobrze koreluje nie tylko z nasileniem włóknienia, ale także z aktywnością zapalną w tkance wątrobowej [156]. Według niektórych autorów, stałe utrzymywanie się podwyższonego poziomu TGF- β 1 w osoczu u pacjentów z PZW może być wartościowym wskaźnikiem przy kwalifikowaniu chorych do leczenia. W grupie nieleczonych pacjentów z PZW typu C wykazano, że zachowanie się poziomu tej cytokiny monitorowane przez dłuższy czas (12 miesięcy) wyraźnie korelowało ze stopniem włóknienia wątroby. U chorych, u których obserwowano stabilne stężenie poziomu TGF- β 1 w osoczu, nie wykazano progresji włóknienia. Podobne wnioski wysunięto na podstawie ekspresji TGF- β 1 w wątrobie [110]. Wydaje się więc, że pacjenci z utrzymującym się podwyższonym stężeniem tej cytokiny we krwi winni być traktowani jako grupa szczególnie zagrożona postępującym włóknieniem wątroby i w związku z tym wcześniej kwalifikowani do terapii. Ponadto badania przeprowadzone u dorosłych chorych z marskością wątroby wykazały, że poziom TGF- β 1 w osoczu koreluje dodatnio ze skalą Child-Pugh [63] i poziomem bilirubiny oraz ujemnie z poziomem

albumin w surowicy krwi [117]. Daje to nadzieje na wykorzystane tego parametru jako dodatkowego wskaźnika pogarszającej się wydolności wątroby.

W badanej grupie dzieci z PZW przeprowadzono szczegółową analizę poziomu TGF- β 1 w osoczu, nie wykazując różnic w porównaniu z grupą kontrolną ani w zależności od rozpoznania. Nie stwierdzono ponadto zależności między poziomem badanej cytokiny a aktywnością zapalną czy nasileniem włóknienia w wątrobie. Badana grupa dzieci była jednak nieliczna i u większości pacjentów stwierdzano mało nasilone włóknienie. Doniesienia na temat znaczenia oznaczania poziomu TGF- β 1 w osoczu w PZW dzieci nie są tak jednoznaczne jak u dorosłych. *Lebensztejn i wsp.* badając dzieci z PZW typu B wykazali znamienne wyższy poziom TGF- β 1 w osoczu u chorych w porównaniu z grupą kontrolną. W odróżnieniu od danych uzyskanych u dorosłych, w tej grupie badanych nie wykazano różnic w poziomie tej cytokiny w zależności od wyniku leczenia IFN- α ani korelacji z nasileniem włóknienia w wątrobie [134, 135, 136]. Natomiast w grupie 36 dzieci z PZW typu B leczonych lamiwudyną, *Schneiberg i wsp.* wykazali znamienne wyższe poziomy tej cytokiny przed rozpoczęciem terapii w porównaniu z grupą kontrolną i istotny jej spadek po 12 miesiącach leczenia. Podobnej tendencji nie wykazano w grupie dzieci z PZW typu B, które uprzednio były nieskutecznie leczone IFN- α . U tych chorych podwyższone stężenie TGF- β 1 w osoczu utrzymywało się przez cały czas, zarówno podczas leczenia, jak i po jego zakończeniu [225].

Wielu autorów poszukiwało ewentualnej zależności między poziomem tej cytokiny w osoczu a biochemicznymi markerami uszkodzenia wątroby. Doniesienia na ten temat są rozbieżne. Zdecydowanie przeważa opinia (także dla populacji pediatrycznej), że brak jest korelacji między tymi parametrami [63, 110, 135, 136, 185]. *Fisiak i wsp.* u pacjentów z PZW typu C wykazali korelacje jedynie między poziomem TGF- β 1 w osoczu a aktywnością aminotransferazy asparaginianowej (AST) [60]. Prawdopodobnie brak zależności między poziomem TGF- β 1 w osoczu a biochemicznymi wykładnikami aktywnego procesu zapalnego wątroby w grupie pacjentów z PZW typu C wynika z faktu, iż jest to proces postępujący powoli, zwykle o małej aktywności zapalnej, często prowadzący do nasilonego włóknienia i rzadko manifestujący się klinicznie ostrym zapaleniem. Dla analizowanych w niniejszej pracy parametrów biochemicznych, w całej grupie badanych dzieci z PZW, stwierdzono jedynie statystycznie istotną zależność między poziomem TGF- β 1 w osoczu a aktywnością GGTP. Nie przeprowadzono powyższej analizy dla poszczególnych rodzajów PZW ze względu na niewielką liczbę pacjentów w badanych podgrupach chorych.

Doniesienia na temat zachowania się TGF- β 1 w osoczu u pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) są nieliczne, aczkolwiek zdecydowanie podkreślają znamienne wyższy jego poziom w aktywnym okresie choroby w porównaniu z grupą kontrolną i wynikami uzyskanymi w okresie remisji choroby [14, 220]. Jednak w badanej grupie 7 pacjentów z I typem AIH w aktywnym okresie choroby nie wykazano różnic w poziomie TGF- β 1 w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną i pacjentami, u których rozpoznano PZW o etiologii wirusowej. Nie wykazano także zależności między poziomem TGF- β 1 w osoczu, nasileniem reakcji immunohistochemicznej oraz poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 w tkance wątrobowej. *Bayer i wsp.* w okresie aktywnym choroby stwierdzili nie tylko znacznie podwyższony poziom TGF- β 1

w osoczu, ale również silną jego ekspresję miejscową w zmienionej zapalnie tkance wątrobowej. Wykazali ponadto obniżanie się obu parametrów wraz z remisją choroby. Nie stwierdzono natomiast tak wyraźnej zależności między tkankową ekspresją TGF- β 1 a biochemicznymi markerami aktywności choroby [14]. Przyczyna opisanych zmian nie jest ostatecznie wyjaśniona. Bierze się pod uwagę możliwość spontanicznej immunosupresji ustroju mającej na celu poprawę własnych zaburzeń autoimmunologicznych. Wiadomo bowiem, że TGF- β 1 ma niezwykle silne działanie immunosupresyjne. Być może wysoki poziom tej cytokiny obserwowany u nieleczonych pacjentów jest wyrazem naturalnego, ochronnego działania ustroju [145]. Badania doświadczalne przeprowadzone na zwierzętach z autoimmunologicznym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu oraz zapaleniem stawów wykazały korzystny wpływ egzogenego TGF- β 1 na przebieg choroby [25, 125]. Badania *Sakaguchi i wsp.* podkreślają ewentualny udział w patogenezie AIH obniżonej ekspresji receptora typu II dla TGF- β 1 (T β RII) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC). Wykazali bowiem znamienne niższą jego ekspresję u tych chorych zarówno w okresie aktywnym, jak i w remisji, w porównaniu z grupą kontrolną i pacjentami z PZW typu C. Natomiast badany jednocześnie poziom TGF- β 1 w osoczu u chorych z AIH był istotnie wyższy [220]. Być może zbyt niska ekspresja T β RII uniemożliwia prawidłową aktywność immunosupresyjną TGF- β 1 u tych chorych, a podwyższony poziom TGF- β 1 w osoczu jest skutkiem pobudzenia jego wydzielania, wtórnie wobec braku bądź obniżonych efektów jego działania [34]. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań, wiadomo bowiem, że podwyższony poziom TGF- β 1 w osoczu obserwowany jest także w innych stanach zapalnych wątroby, gdzie nie udowodniono udziału mechanizmów autoimmunologicznych.

Udział TGF- β 1 w patogenezie przewlekłych schorzeń wątroby jest złożony, o wielu punktach uchwytu. Uszkodzenie hepatocytów wywołane przez różne czynniki staje się bodźcem powodującym uaktywnienie komórek Kupffera i płytek krwi. Uszkodzone komórki wątrobowe ulegają fagocytozie, której towarzyszy uwalnianie różnych cytokin m.in. płytkopochodnego czynnika wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF), TNF- α oraz TGF- β 1. Również same pobudzone makrofagi mogą nasilać uszkodzenie hepatocytów poprzez produkcję niektórych cytokin (np. TNF- α) czy enzymów proteolitycznych. Masywne uszkodzenie wątroby prowadząc do odsłonięcia włókien kolagenowych, może sprzyjać adhezji i agregacji płytek krwi będących bogatym źródłem TGF- β 1 oraz PDGF. Zjawisko to jest nasilane poprzez działanie czynnika aktywującego płytki (*platelet activating factor* – PAF). Zarówno TGF- β 1, jak i PDGF aktywują komórki gwiaździste uwalniające PAF, pobudzający z kolei płytki krwi do produkcji TGF- β 1 oraz PDGF. W ten sposób proces włóknienia postępuje dalej, będąc nadal aktywowany w mechanizmie autokrynnego błędnego koła, nawet po zaprzestaniu działania czynnika etiologicznego prowadzącego pierwotnie do uszkodzenia wątroby. Należy podkreślić, że TGF- β 1 może wywoływać także apoptozę hepatocytów [64, 78]. W badaniach *in vitro* udowodniono, że TGF- β 1 ma niewątpliwy wpływ na produkcję kolagenu przez wątrobowe myofibroblasty oraz komórki Ito [64, 255].

Obok niego także inne cytokiny pobudzają produkcję kolagenu, aczkolwiek w mniejszym stopniu. Są to IL-4, 1L-1 β czy PDGF. Do cytokin o działaniu przeciwnym,

czyli hamującym syntezę kolagenu i innych składników ECM, należą: IFN α i γ , IL-1 α , TNF- α czy TGF- α [64, 255]. TGF- β 1 wydaje się być podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za włóknienie wątroby, między innymi poprzez hamowanie degradacji białek wchodzących w skład ECM. Jest to przede wszystkim skutkiem blokowania syntezy i uwalniania proteaz oraz udziału w produkcji inhibitorów wobec metaloproteinaz [64]. TGF- β 1 może stymulować także niektóre białka ECM (fibronektyna, kolagen), aktywować typ I kolagenu oraz nasilać jego sekrecję przez komórki gwiazdziste [127]. Biorąc pod uwagę wymienione właściwości TGF- β 1, a więc działanie stymulujące proces włóknienia, obserwowany przez wielu autorów spadek jego stężenia we krwi w trakcie leczenia u pacjentów z PZW wydaje się pozytywnym czynnikiem prognostycznym. Wiadomo, że poza opisanym niekorzystnym (nasilającym włóknienie) działaniem TGF- β 1, bierze on udział w regeneracji wątroby. Szereg obserwacji, przede wszystkim doświadczalnych, wskazuje na istotny wzrost miejscowej ekspresji TGF- β 1 we wczesnym okresie regeneracji wątroby. Być może początkowy brak lub słabo wyrażone efekty działania antyproliferacyjnego wynikają z przejściowego osłabienia ekspresji receptorów dla TGF- β 1, a z nie z niedoboru samego TGF- β 1 [42, 43, 77].

Badania wykazały, że podawanie rekombinowanego TGF- β 1 w przypadku zakażenia HBV skutkowało zależnym od dawki zahamowaniem indukowanej przez HBV produkcji IFN- γ oraz przeciwciał anti-HBc [105].

U chorych z PZW typu C bierze się pod uwagę blokujące działanie podwyższonego poziomu TGF- β 1 na funkcje limfocytów T cytotoksycznych biorących udział w rozwoju przewlekłego zapalenia [109]. Badania *in vitro* wskazują także na hamujące działanie TGF- β 1 na replikację wirusowego RNA oraz ekspresję białek HCV. Odbywa się to prawdopodobnie na drodze mechanizmu Smad-zależnego [180]. Wielu autorów zwraca uwagę na zależność między poziomem we krwi TGF- β 1 a ewentualną transformacją nowotworową u chorych z PZW [160, 217]. Wykazano, że stężenie tej cytokiny jest znacznie wyższe u chorych z rakiem wątrobowokomórkowym (*carcinoma hepatocellulare* – HCC) w porównaniu z pacjentami z PZW, a nawet z marskością wątroby. Co więcej, u większości chorych poziom TGF- β 1 korelował ze stężeniem alfa-fetoproteiny (AFP) we krwi, obniżał się natomiast po skutecznym leczeniu HCC [228]. *Sacco i wsp.* wykazali znamienne wyższy poziom TGF- β 1 w osoczu u ponad 20% badanych pacjentów z HCC, u których stwierdzono prawidłowe stężenie AFP. Korespondują z tym spostrzeżenia *Murawaki i wsp.* o korelacji poziomu TGF- β 1 w osoczu z włóknieniem wątroby jedynie w przypadku nasilonych zmian. Wiadomo bowiem, że masywne włóknienie, a przede wszystkim marskość wątroby, stanowi podstawowy czynnik ryzyka rozwoju HCC [182]. Interesujące są doniesienia *Tsai i wsp.* na temat oceny poziomu TGF- β 1 w moczu u pacjentów z PZW typu C i u chorych z HCC na tle marskości wątroby. Autorzy wykazali znamienne, dodatnią korelację poziomu tej cytokiny w moczu z przebiegiem choroby. U pacjentów z marskością wątroby stężenie TGF- β 1 w moczu było znamienne wyższe niż u pacjentów z PZW bez cech marskości, obserwowano także wyraźną zależność poziomu tej cytokiny od klasyfikacji Child-Pugh. Stwierdzono także, że w przypadku HCC poziom TGF- β 1 w moczu korelował m.in.: z wielkością guza, czasem przeżycia oraz wynikami leczenia. Wydaje się więc, że szczególnie u pacjentów z HCC, u których poziom AFP jest prawidłowy, stężenie TGF- β 1

w moczu, podobnie jak w osoczu, może być wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby i wyników leczenia [217, 257, 258].

W pracy niniejszej, poza oznaczeniem stężenia TGF- β 1 w osoczu w badanej grupie pacjentów z PZW, oceniano również miejscową ekspresję TGF- β 1. Badanie immunohistochemiczne (IHC) wykazało stosunkowo słabo nasiloną reakcję na obecność TGF- β 1 w tkance wątrobowej. Wydaje się więc, że można to tłumaczyć niewielkim nasileniem włóknienia obserwowanym w badanej grupie dzieci z PZW. Nie wykazano również korelacji między ekspresją TGF- β 1 ocenianą metodą immunohistochemiczną a aktywnością zapalną i zaawansowaniem włóknienia w wątrobie.

Dostępne dane z piśmiennictwa na ten temat dotyczą jedynie dorosłych, u których nasilenie włóknienia jest zwykle większe, co w przypadku wirusowych zapaleń wątroby jest skutkiem przede wszystkim dłuższego czasu trwania choroby. Wyniki badań wskazują na nasiloną ekspresję TGF- β 1 w wycinkach wątroby u chorych z PZW typu B głównie w obszarze ognisk martwicy oraz masywnego włóknienia [144]. *Kinnman i wsp.* oceniając nasilenie reakcji immunohistochemicznej w tkance wątrobowej u nieleczonych chorych z PZW typu C, wykazali w ogniskach nasilonego zapalenia i włóknienia wzmożoną ekspresję trzech izoform TGF- β (1-3) oraz białka transportującego latentną postać tej cytokiny (LTPB), sugerując udział w patogenezie wszystkich 3 izoform, a nie tylko TGF- β 1 [116]. Inna grupa badaczy u większości badanych chorych z PZW typu C wykazała wprawdzie obecność TGF- β 1 w komórkach zatokowych, nie obserwując jednak, podobnie jak w niniejszej pracy, korelacji między jego ekspresją a zmianami histopatologicznymi w tkance wątrobowej. Interesującym jest fakt, iż u tych samych chorych obserwowali oni korelację między poziomem TGF- β 1 w osoczu a stopniem włóknienia wątroby [185]. Natomiast u pacjentów z AIH *Bayer i wsp.* w aktywnej fazie choroby wykazali silną ekspresję TGF- β 1 nie tylko w najbliższym sąsiedztwie nacieków zapalnych, lecz również w obszarze bardziej odległym, ale w obrębie zrazika [14]. W badaniach własnych oceniając poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w biopatach wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR), również nie wykazano różnic między chorymi z PZW a grupą kontrolną czy pacjentami z NZJ. Podobnie *Kamar i wsp.* u 18 pacjentów z PZW typu C po przeszczepie nerki, leczonych 12 miesięcy ribawiryną nie obserwował w tkance wątrobowej zmian w zakresie poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1, IFN- γ oraz IL-10, porównując wyniki przed i po zakończeniu terapii. Należy zaznaczyć, że zastosowana terapia nie skutkowała w badanej grupie eliminacją HCV czy obniżeniem wirerii. Istotnym jest fakt znacznej akceleracji włóknienia wątroby u tych chorych, będący najprawdopodobniej skutkiem nasilonej hemolizy indukowanej przez ribawirynę i odkładania się żelaza w wątrobie. Zostało to potwierdzone badaniem histologicznym biopłatu wątroby [106].

Interesujące są wyniki autorów polskich, którzy badali zależność średniego dobowego stężenia TGF- β 1 w surowicy i ilościowej oceny mRNA genu kodującego TGF- β 1 w biopatach wątroby u chorych z PZW typu B. Wykazano wyższy poziom mRNA w tkance chorych z PZW typu B w porównaniu z grupą kontrolną. U pacjentów z włóknieniem wątroby ocenionym jako średnie lub nasilone nie obserwowano korelacji między stężeniem tej cytokiny we krwi a poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1

w tkance wątrobowej. Stwierdzono ją natomiast u osób, u których w wątrobie wykazano zmiany minimalne [157]. W badaniach własnych nie wykazano podobnej zależności, mimo że w analizowanej grupie dzieci również nie obserwowano nasilonego włóknienia wątroby. Nie stwierdzono także korelacji między aktywnością zapalną a poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 w tkance wątrobowej.

Ciekawe są spostrzeżenia *Murakami i wsp.*, którzy w badaniach *in vitro* na komórkach zwierzęcych wykazali hamujący wpływ kwasu ursolowego na efekty działania TGF- β 1, przede wszystkim poprzez blokowanie wiązania się tej cytokiny z odpowiednim receptorem. Prowadziło to do zahamowania proliferacji komórek nabłonkowych oraz indukowanej przez TGF- β 1 produkcji kolagenu [179]. Tym prawdopodobnie należy tłumaczyć dobre efekty stosowania u pacjentów z zapaleniem wątroby preparatów ziołowych zawierających kwas ursolowy [142, 143].

Obserwacje dotyczące dekoryny, małego proteoglikanu macierzy zewnątrzkomórkowej, wskazują na jej hamujący wpływ na proces włóknienia poprzez wiązanie się z TGF- β 1 i modyfikowanie jego działania [191, 274].

W badanej grupie dzieci z PZW nie znaleziono zależności między poziomem TGF- β 1 w osoczu a wynikami badania immunohistochemicznego i molekularnego na obecność TGF- β 1. Dla całej populacji badanych dzieci z PZW wykazano natomiast dodatnią korelację poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w tkance z aktywnością aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz wartością OB. U dzieci z AIH stwierdzono ponadto tendencję (na granicy znamienności statystycznej $p=0,05$) do zależności między poziomem białka całkowitego, wartością OB, poziomem żelaza oraz liczbą białych krwinek i poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 w biopsjach wątroby.

Wydaje się jednak, że na podstawie wyników uzyskanych w grupie pacjentów z PZW nie można wyciągać ogólnych wniosków. Ograniczenia powyższe wynikają przede wszystkim z niewielkiej liczby dzieci z PZW, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia analizowanie wyników badań w grupach z różnymi rodzajami PZW. Być może brak zależności między osoczymym stężeniem TGF- β 1 i jego miejscową ekspresją badaną metodą immunohistochemiczną i molekularną a zmianami histopatologicznymi jest również wynikiem niewielkiej aktywności zapalnej i niewielkiego nasilenia włóknienia. Większość doniesień z piśmiennictwa dotyczących chorych z PZW podkreśla przede wszystkim związek ekspresji TGF- β 1 z procesem włóknienia, zwłaszcza w stadiach zaawansowanych. Podstawowym utrudnieniem w interpretowaniu wyników badań uzyskanych z materiału tkankowego (biopsja wątroby) był brak grupy kontrolnej. W niniejszej pracy nie stworzono grupy kontrolnej dla pacjentów z PZW w aspekcie wyników badań ocenianych w tkance wątrobowej. Obiektywną grupę kontrolną dla chorych z PZW stanowiłyby osoby, u których nie stwierdza się cech patologii wątroby ani dróg żółciowych. Jednak w związku z tym, że biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym, obarczonym licznymi, często poważnymi powikłaniami, z przyczyn etycznych nawet nie podejmowano starań o jej utworzenie. Analiza danych z piśmiennictwa dotycząca grup kontrolnych, a właściwie porównawczych wobec chorych z PZW wykazała, że autorzy korzystali głównie z populacji pacjentów, u których stwierdzano patologię wątroby o niewielkim bądź minimalnym nasileniu i u których istniały medyczne wskazania do wykonania biopsji tego narządu [110, 157]. Wydaje się więc, że stworzenie grupy kontrolnej dla porów-

nania wyników badań ocenianych w tkance wątrobowej jest bardzo trudne lub nawet wręcz niemożliwe. Być może wyniki oceny TGF- β 1 w tkance wątrobowej winny być wykorzystane u poszczególnych chorych przede wszystkim do monitorowania przebiegu choroby (głównie włóknienia) oraz ustalenia wskazań do wdrożenia leczenia.

6.4. Transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1) oraz inne wybrane cytokiny w nieswoistych zapaleniach jelit

W dostępnym piśmiennictwie zdecydowanie mniej jest doniesień na temat udziału TGF- β 1 w patogenezie i przebiegu nieswoistych zapaleń jelit (NZJ). Prawdopodobnie należy to tłumaczyć tym, iż udział TGF- β 1 w procesie włóknienia poprzez pobudzenie produkcji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) jest zdecydowanie bardziej wyraźny i łatwiejszy do oceny w wątrobie niż w wycinkach jelit. Jednak wobec niewątpliwego udziału cytokin w patogenezie NZJ, cały czas trwają badania nad zaangażowaniem TGF- β 1 również w tych schorzeniach. Doniesienia dotyczące dzieci są jednak pojedyncze [104, 275].

W związku z tym, w niniejszej pracy właśnie przede wszystkim dzieci z NZJ poddano wszechstronnej analizie pod kątem zachowania się TGF- β 1 zarówno w osoczu, jak i w wycinkach błony śluzowej jelit. Badana grupa była stosunkowo liczna i jednorodna pod względem rozpoznania. Liczyła bowiem 104 dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit, w tym 68 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC) i 36 z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD). Zdecydowana większość pacjentów (ponad 80%) w chwili badania była w aktywnym okresie choroby, u około 60% z nich rozpoznawano w tym czasie łagodną postać schorzenia. Jedynie ok. 8% dzieci z NZJ zakwalifikowano do grupy o przebiegu ciężkim. Dominowali w niej pacjenci z UC. W badanej populacji dzieci z NZJ nie wykazano istotnej statystycznie różnicy stężenia TGF- β 1 w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną czy omawianymi wcześniej pacjentami z PZW. Różnic nie odnotowano również w zależności od rodzaju schorzenia (CD, UC). Dane z piśmiennictwa na ten temat nie są jednoznaczne. Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach są zgodne z doniesieniami *Sturm i wsp.*, którzy nie wykazali istotnych statystycznie różnic w stężeniu TGF- β 1 i HGF (*hepatocyte growth factor* – czynnik wzrostu hepatocytów) w surowicy między pacjentami z NZJ a grupą kontrolną. Obserwowali jednak, podobnie jak w niniejszych badaniach, wyższe wartości u chorych. Poziomy TGF- β 1 nie były również elementem różnicującym CD i UC [239]. *Kader i wsp.* w grupie 88 dzieci z NZJ (65 CD i 23 UC) badali w osoczu poziom ponad 70 różnych cytokin i czynników wzrostu, w tym także TGF- β . Wykazali oni, że wśród analizowanych cytokin u pacjentów z CD w okresie remisji, stężenie czterech z nich: PLGF (łożyskowy czynnik wzrostu), IL-7, IL12p40 oraz TGF- β 1 było znamienne wyższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi w aktywnej fazie choroby. Natomiast w grupie chorych z UC podobne różnice dotyczyły tylko jednej z badanych cytokin – IL-12p40 [104]. Autorzy podkreślają odmienne zachowanie się „profilu cytokinowego” u chorych z CD i UC. Jest to najprawdopodobniej konsekwencją tego, że przebieg CD modyfikują przede wszystkim komórki Th1, zaś limfocyty Th2 – UC. Natomiast komórki regulatorowe Th3, produkujące m.in. TGF- β 1 są włączone w rozwój tolerancji pokarmowej oraz regulację (hamowa-

nie) odpowiedzi immunologicznej. Autorzy zwracają również uwagę na brak spadku poziomu cytokin prozapalnych wraz z poprawą stanu pacjentów [104]. Wielu badaczy podkreśla wielokierunkowe działanie TGF- β 1 w stanach zapalnych jelit. Jak wiadomo, jest on przeciwzapalnym czynnikiem wzrostu modyfikującym przyleganie komórek, chemotaksję oraz homeostazę regulowaną przez limfocyty T. Stymuluje także dojrzewanie nabłonka jelitowego, produkcję kolagenu, gojenie się owrzodzeń oraz może ukierunkowywać limfocyty T w komórki T regulatorowe [104]. Nie jest ostatecznie wyjaśnione, dlaczego w badaniach *Kadera i wsp.* wykazano podwyższony poziom tej cytokiny w okresie remisji jedynie u dzieci z CD. Wydaje się, że ekspresja TGF- β 1 pozwala raczej na potwierdzenie obecności zapalenia, a nie daje możliwości różnicowania na jej podstawie między CD i UC. Należy pamiętać, że niektóre cytokiny, których ekspresja jest wyraźna lokalnie w zmienionej zapalnie tkance u chorych z NZJ, nie są wykrywane we krwi (np. IL-1, IL-8). Ich ocena jedynie we krwi może prowadzić do wyciągania błędnych wniosków na temat ich udziału w patogenezie NZJ [104].

Odmienne dane na temat zachowania się w osoczu innych, poza TGF- β 1, cytokin u chorych z NZJ przedstawili *Kazanawa i wsp.* Oceniali oni poziom czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) i czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) stwierdzając znamienne wyższe poziomy obu badanych czynników wzrostu w grupie pacjentów w aktywnej fazie choroby w porównaniu z grupą kontrolną oraz z pacjentami będącymi w okresie remisji [108].

Matsuura i wsp. obserwowali ponadto pozytywny, terapeutyczny efekt doodbytniczej podaży zwierzętom doświadczalnym z zapaleniem jelit czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) [158]. Jego korzystne działanie wynika prawdopodobnie ze stymulacji regeneracji nabłonka, proliferacji komórek na drodze TGF- β -zależnej oraz zwiększania produkcji samego TGF- β 1 w nabłonku jelitowym i fibroblastach [92]. *Wiercińska-Drapała i wsp.* wykazali wyższe poziomy IL-18 w surowicy pacjentów z UC, jednak nie były to różnice istotne statystycznie. Autorzy ci stwierdzili natomiast, że stężenie badanej cytokiny u chorych korelowało dodatnio z nasileniem zmian endoskopowych, stopniem klinicznej aktywności choroby oraz z poziomem białka C-reaktywnego. Nie obserwowali jednak zależności między miejscową ekspresją IL-18 w błonie śluzowej jelita a przebiegiem choroby, sugerując iż podwyższone stężenie w surowicy nie wynika ze wzmożonej jej produkcji jedynie przez zmienioną zapalnie błonę śluzową jelita. Interleukina-18 indukując produkcję IFN- γ odgrywa istotną rolę w modyfikowaniu odpowiedzi immunologicznej zarówno Th1, jak i Th2. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że neutralizacja IL-18 za pomocą specyficznych przeciwciał prowadziła do zmniejszenia nasilenia objawów zapalenia jelit [270]. Interesującym jest także udział innych cytokin w patogenezie NZJ. Szereg badań podkreśla znaczenie czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), który jest określany jako potencjalny mitogen dla komórek nabłonkowych różnego pochodzenia, w tym także przewodu pokarmowego. Reguluje on wzrost oraz przyspiesza naprawę nabłonka po uszkodzeniu. U zwierząt z doświadczalnym zapaleniem jelit wykazano zwiększoną miejscową ekspresję HGF oraz podwyższony jego poziom w osoczu. Wyniki badań podkreślają terapeutyczne działanie HGF w eksperymentalnych zapaleniach jelit. Dożylny jego podanie skutkowało pozytywnie w ostrej niewydolności wątroby, nie mając jednak

wpływu na schorzenia jelit, gdzie zdecydowanie bardziej efektywna jest droga doodbytnicza [92]. Jednak poglądy na ten temat nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy sugerują nawet, że podwyższone stężenie HGF we krwi może skutkować uwalnianiem innych prozapalnych cytokin. Podnoszona jest także możliwość jego przeciwnego działania wobec aktywności TGF- β 1 polegającej na hamowaniu proliferacji komórek [239]. U dzieci z NZJ *Srivastava i wsp.* wykazali znamienne wyższy poziom tego czynnika wzrostu niż w grupie kontrolnej. Zarówno dla pacjentów z CD, jak i UC obserwowali ponadto dodatnią korelację między stężeniem HGF a aktywnością choroby. Nie wydaje się, aby na jego osoczowy poziom miały wpływ takie czynniki, jak: wiek i płeć badanych czy lokalizacja zmian chorobowych w przewodzie pokarmowym [235]. Natomiast *Strum i wsp.* w populacji dorosłych z NZJ, mimo tendencji do wartości wyższych, nie obserwowali istotnej różnicy między poziomem HGF u chorych i w grupie kontrolnej [239]. W analizowanych grupach dzieci z NZJ (także oddzielnie dla CD i UC) nie wykazano różnicy w zakresie osoczowego stężenia TGF- β 1 w zależności od fazy choroby, w jakiej wykonywano oznaczenie (aktywny okres: początek i nawrót czy remisja). Nie obserwowano także różnic znamienych statystycznie w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby, aczkolwiek średni poziom tej cytokiny wzrastał wraz wyższym indeksem aktywności choroby. Być może wynika to z faktu, że w analizowanej grupie dzieci z NZJ w chwili badania dominowali pacjenci z mało nasiloną aktywnością schorzenia. Obserwacje poczynione w niniejszej pracy są podobne do stwierdzonych przez *Sturm i wsp.*, którzy wykazali, że poziom TGF- β 1 u 74 dorosłych pacjentów z NZJ (28 UC i 45 CD) nie różnił się istotnie w zależności od stopnia aktywności choroby ani od wartości stwierdzonych w grupie kontrolnej [239]. W badaniach własnych nie wykazano korelacji między poziomem TGF- β 1 w osoczu a badanymi parametrami biochemicznymi. Doniesienia z piśmiennictwa na ten temat nie są jednoznaczne. Autorzy niemieccy badając TGF- β 1 i HGF w osoczu u chorych z NZJ stwierdzili u pacjentów z CD dodatnią korelację poziomu TGF- β 1 jedynie z liczbą płytek krwi, zaś w grupie z UC nie wykazano żadnych zależności. U tych samych chorych obserwowano natomiast dodatnią korelację między poziomem HGF a liczbą białych krwinek w morfologii krwi obwodowej, ujemną natomiast zależność wobec poziomu albumin w surowicy krwi oraz wartości hematokrytu [239].

W badanej grupie dzieci z NZJ interesująca natomiast jest analiza zbiorcza oraz indywidualna wyników badań poziomu TGF- β 1 w osoczu oznaczanego dwukrotnie u tych samych chorych: w aktywnym okresie choroby oraz w remisji. Wykazano bowiem znamienne statystycznie różnicę w uzyskanych wynikach ($p=0,005$). Wartości wyższe obserwowano w aktywnym okresie choroby. Ponadto porównano stężenia TGF- β 1 w osoczu mierzone w tej grupie dzieci z jego poziomem w grupie kontrolnej, wykazując znamienne wyższe wartości w fazie aktywnej choroby ($p=0,03$). Natomiast poziomy badane w czasie remisji nie różniły się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki powyższe są odmienne od poczynionych przez *Kadera i wsp.* u pacjentów z CD [104].

Analizę powyższą przeprowadzono łącznie dla całej grupy dzieci z NZJ, u których badanie wykonano dwukrotnie (w okresie aktywnym choroby i w czasie remisji). Nie rozpatrywano tego zagadnienia oddzielnie dla chorych z CD i UC, kierując się przede wszystkim niewielką liczbą pacjentów posiadających powtórne badania oraz

faktem, iż w analizie indywidualnej u wszystkich chorych, niezależnie od typu NZJ, obserwowano spadek poziomu tej cytokiny w osoczu w okresie remisji.

Podobnie jak w przypadku pacjentów z PZW, także w tej grupie dzieci, poza oceną stężenia TGF- β 1 w osoczu oceniano również miejscową ekspresję TGF- β 1. Badanie immunohistochemiczne (IHC) na obecność tej cytokiny nie wykazało istotnych statystycznie różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Nasilenie reakcji IHC na obecność TGF- β 1 było porównywalne w obu podgrupach dzieci z NZJ (UC i CD). Doniesienia na ten temat są nieliczne i często niejednoznaczne. *Lawrence i wsp.* obserwowali różną lokalizację nasiloniej ekspresji TGF- β 1 w wycinkach jelit u pacjentów z NZJ w zależności od rozpoznania. U chorych z CD największe nasilenie reakcji IHC stwierdzane było śródściennie, natomiast w przypadku UC podśluzówkowo oraz w obrębie blaszki właściwej i wyraźnie korelowało z obecnością nacieków zapalnych. Autorzy uważają jednak, że raczej nie typ schorzenia, a aktualna rozległość procesu zapalnego wpływa na rozkład TGF- β 1 w jelicie [132]. Szereg prac podkreśla także ewentualny udział innych izoform TGF- β w patogenezie NZJ. Wyniki badań *Kanazawy i wsp.* wykazały brak ekspresji TGF- β 1 w materiale tkankowym uzyskanym od pacjentów zarówno z CD, jak i z UC będących w aktywnym okresie choroby. U części z tych chorych stwierdzili natomiast podobną ekspresję jego izoform β 2 i β 3. Jednocześnie w obu typach NZJ w komórkach śródłonkowych wykazano stosunkowo silną ekspresję czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) oraz czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), biorących udział w angiogenezie i procesach regeneracji [108]. Ciekawe są spostrzeżenia *McKaig i wsp.*, którzy w hodowlach myofibroblastów jelitowych (niezależnie czy pochodziły z tkanek zdrowych czy zmienionych zapalnie) wykazali podobną ekspresję TGF- β 1, natomiast w zależności od typu NZJ inną jego izoformę 2 i 3. Jeżeli źródłem myofibroblastów było jelito zmienione zapalnie, w przebiegu CD dominowała izoforma β 2, praktycznie nieobecna w hodowlach pochodzących od zdrowych i od chorych z UC. W hodowlach tych obserwowano również żywą proliferację myofibroblastów oraz wzmożoną ekspresję tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1 (TIMP-1). Być może tymi zjawiskami można tłumaczyć predyspozycję chorych z CD do nasilonego włóknienia i powstawania zwężeń w obrębie jelit [165, 166]. W badanej grupie dzieci w wycinkach jelit oznaczano jedynie ekspresję izoformy TGF- β 1, która była podobna w obu typach NZJ. Być może jednoczesna analiza zachowania się również dwóch pozostałych izoform TGF- β pozwoliłaby na wyciągnięcie wniosków na temat możliwości różnicowania na tej podstawie typów NZJ. Doświadczenia przeprowadzone przez *Zotto i wsp.* wskazują na inny model produkcji TGF- β 1 u pacjentów z CD i UC. Wykazano bowiem, że stymulowane hodowle komórek jednojądrzastych blaszki właściwej (LPMC) pochodzące od chorych z CD produkowały zamiennie mniejsze ilości TGF- β 1 niż w grupie kontrolnej. Odwrotnie, w przypadku UC produkcja tej cytokiny była istotnie wyższa [45]. Dane z piśmiennictwa wskazują, że u pacjentów z NZJ analizowano również miejscową (w wycinkach błony śluzowej jelit) ekspresję innych czynników wzrostu. Badacze japońscy w grupie 22 pacjentów wykazali nie tylko podwyższony poziom VEGF i FGF w surowicy, ale również nasiloną ich ekspresję w komórkach śródbłonka jelit. Wyniki otrzymane u chorych z CD i UC były porównywalne [108]. W badanej grupie chorych

z NZJ nie wykazano zależności między wynikiem badania IHC na obecność TGF- β 1 a obrazem histologicznym wycinków błony śluzowej jelit, wynikami badania kolonoskopowego oraz poziomem TGF- β 1 w osoczu.

W badaniach własnych wiele interesujących spostrzeżeń uzyskano oceniając poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym w wycinkach błony śluzowej jelit uzyskanych podczas badania kolonoskopowego. Badanie endoskopowe wykonywano u zdecydowanej większości dzieci w aktywnym okresie schorzenia, pobierając wycinki z miejsc makroskopowo zmienionych zapalnie oraz, u części pacjentów, z miejsc niezmienionych chorobowo. U 10 pacjentów uzyskano ponownie wycinki błony śluzowej jelita w okresie remisji podczas planowo wykonywanej kontroli kolonoskopii.

Wykazano istotną statystycznie różnicę między grupą kontrolną a wynikami uzyskanymi od chorych z NZJ w aktywnym okresie choroby, gdy wycinek pochodził z błony śluzowej jelita makroskopowo zmienionego (wartości wyższe w grupie chorych). W analizie szczegółowej stwierdzono, że różnica dotyczyła przede wszystkim dzieci z UC, a w przypadku pacjentów z CD była na granicy znamienności statystycznej ($p=0,05$). Nie obserwowano natomiast podobnych różnic, gdy pobrany wycinek pochodził z miejsca ocenionego jak niezmienione w badaniu kolonoskopowym (zarówno dla całej grupy chorych z NZJ, jak i oddzielnie z CD i UC).

Wykazano ponadto różnicę znamiennej statystycznie ($p=0,001$) zarówno dla całej populacji dzieci z NZJ, jak i w poszczególnych podgrupach (CD i UC) w poziomie mRNA genu kodującego TGF- β 1, gdy porównywano wyniki uzyskane w biopsjach błony śluzowej jelit pobranych jednocześnie w aktywnym okresie choroby, ale z dwóch różnych miejsc: makroskopowo zmienionego zapalnie oraz ocenionego jako prawidłowy. Wartości wyższe stwierdzono w tkance ocenionej jako zmieniona w badaniu endoskopowym.

Wyniki otrzymane w wycinkach błony śluzowej jelit uzyskanych w różnych okresach choroby wykazały znamiennej wyższą ekspresję genu kodującego TGF- β 1, gdy wycinek błony śluzowej jelita pobrano od pacjentów będących w czasie nawrotu NZJ. Wartości te były również wyższe niż u chorych, u których badanie przeprowadzono w momencie rozpoznania schorzenia, a więc także w aktywnym okresie choroby. Być może wyższy poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 stwierdzany u pacjentów badanych w czasie kolejnego rzutu choroby jest wynikiem nakładania się pewnej podstawowej ekspresji tego genu, utrzymującej się stale u osób chorych na NZJ, z jego dodatkowo wzmożoną ekspresją w okresie nawrotu. Ze względu na to, że oznaczenia wykonywano w wycinkach błony śluzowej jelit pobieranych od różnych chorych (kryterium zaliczenia do poszczególnych grup był okres choroby, w której znajdował się pacjent w chwili włączenia do badań), można brać również pod uwagę pierwotnie (wyjściowo) wyższy poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 u tych pacjentów, u których wystąpił kolejny nawrót choroby. Być może wyższy poziom mRNA genu *TGF- β 1*, należy traktować jako czynnik ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby. Jedynie przeprowadzenie badań u tych samych chorych w różnych fazach choroby pozwoliłoby na wyciągnięcie ogólnych wniosków.

W badaniach własnych nie obserwowano natomiast istotnych statystycznie różnic poziomu mRNA genu *TGF-β1* w zależności od aktywności choroby zarówno dla całej grupy dzieci z NZJ, jak i w analizowanych podgrupach (CD i UC).

Analogicznie jak w przypadku badania stężenia TGF-β1 w osoczu, interesująca jest analiza zbiorcza oraz indywidualna poziomu mRNA genu kodującego *TGF-β1* ocenianego w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych u tych samych pacjentów dwukrotnie: w aktywnym okresie choroby oraz w remisji. Wykazano bowiem znamienne statystycznie różnice uzyskanych wyników. Wyższe poziomy mRNA genu *TGF-β1* obserwowano w aktywnym okresie choroby ($p=0,004$). Ekspresja genu *TGF-β1* oznaczona w okresie aktywnym w tej grupie pacjentów była również znamienne wyższa w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,03$). Nie wykazano natomiast różnicy między poziomem mRNA genu kodującego TGF-β1 w biopsjach jelit pobranych w okresie remisji u pacjentów z NZJ a grupą kontrolną ($p=0,05$).

Wydaje się, że szczególnie ważne jest wykazanie różnic ekspresji genu *TGF-β1* obserwowane w biopsjach błony śluzowej jelit pobranych od tych samych osób w okresie aktywnym, ale z miejsc ocenionych makroskopowo jako niezmienione oraz w czasie remisji choroby. Wykazano bowiem znamienne niższy poziom mRNA genu kodującego TGF-β1 w wycinkach pobranych w czasie remisji ($p=0,04$). Powyższe wyniki podkreślają wysoką wartość diagnostyczną tej metody ilościowego badania genu *TGF-β1*, która wykrywa zmiany mogące wskazywać na rozwijający się proces zapalny znacznie wcześniej niż badanie endoskopowe. Wycinki błony śluzowej jelit, w których ujawniono wyższą ekspresję genu *TGF-β1* pobrane były w okresie aktywnym choroby (mimo, że oceniono je jako niezmienione makroskopowo), czyli w czasie, gdy najprawdopodobniej miało miejsce bardziej nasilone, ogólnoustrojowe zaburzenie homeostazy immunologicznej niż w czasie remisji. Być może wykonanie w niedługim czasie kolejnej kolonoskopii ujawniłoby również i w tych obszarach obecność zmian zapalnych.

Obserwacje powyższe dotyczą wprawdzie niewielkiej grupy chorych, ale sygnalizują możliwość ewentualnego wykorzystania oceny poziomu mRNA genu kodującego TGF-β1 dla bardziej precyzyjnej oceny zasięgu zmian chorobowych u pacjentów z NZJ.

Poszukując ewentualnej zależności między wynikami wykonanych badań laboratoryjnych a ekspresją genu *TGF-β1* w wycinkach błony śluzowej jelit (ocenianą w miejscach zmienionych zapalnie), dla całej grupy dzieci z NZJ ($p=0,03$) oraz pacjentów z UC ($p=0,04$), wykazano znamienne statystycznie ujemną korelację poziomu żelaza w surowicy z wynikiem badania molekularnego na obecność i zawartość genu kodującego TGF-β1. Podobnej zależności nie obserwowano jednak dla chorych z CD, mimo że poziom żelaza był znamienne niższy także w tej podgrupie chorych z NZJ.

Doniesienia na temat oceny poziomu mRNA genu kodującego TGF-β1 badanego metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym są nieliczne. W badaniach na zwierzętach (psy) w prawidłowej błonie śluzowej dwunastnicy analizowano profil mRNA genów kodujących różne cytokiny. Ekspresja genów kodujących IL-18, TNF-α i TGF-β1 była wyraźna, najsłabiej zaś był zaznaczony poziom mRNA dla IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 i IL-12 [200]. Natomiast *Nguyen i wsp.* w biopsjach jelit zwierząt doświadczalnych (koty) z NZJ oraz u osobników zdrowych wykazali znamienne wyższy poziom mRNA dla genów kodujących takie cy-

tokiny immunoregulujące, jak: IL-10, TGF- β 1 oraz cytokiny prozapalne: IL-6, IL-18, IL-12p40 i TNF- α w porównaniu z wynikami uzyskanymi u zwierząt doświadczalnych z przewlekłą biegunką, u których wykluczono NZJ. Poziom mRNA genu kodującego IL-5 był natomiast wyższy u osobników z NZJ w porównaniu z kontrolą [186]. Korespondują z tym spostrzeżenia *Del Zotto i wsp.*, którzy wykazali wyższą sekrecję tej cytokiny tylko u chorych z UC, sugerując ewentualne wykorzystanie oceny IL-5 jako dodatkowego czynnika różnicującego między CD i UC [45].

Podsumowując wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy, w populacji pacjentów z NZJ, wydaje się, że szczególnie istotne jest powtarzanie oznaczeń w różnych okresach choroby u tych samych pacjentów. U badanych chorych oceniane bowiem stężenie TGF- β 1 w osoczu oraz poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 badany w wycinkach błony śluzowej jelit ściśle korelowały z okresem choroby. Ważne diagnostycznie jest także wykazanie, że ekspresja genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach pochodzących z miejsc ocenionych jako zmienione w badaniu kolonoskopowym była znacznie wyższa niż oznaczana u tych samych chorych w czasie remisji. Spostrzeżenia powyższe sugerują ewentualne wykorzystanie seryjnych oznaczeń TGF- β 1 w osoczu u poszczególnych chorych jako wartościowego wskaźnika aktywności choroby. Określenie natomiast ekspresji genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit stwarza szansę dokładnej oceny faktycznej rozległości procesu chorobowego. Wydaje się, że może mieć to znaczenie nie tylko diagnostyczne, ale także monitorujące wyniki terapii.

Interesującym jest poszukiwanie niezależnych czynników mających ewentualny wpływ na przebieg NZJ. *Srivastava i wsp.* wykazali, że stężenie albuminy w surowicy krwi oraz osoczowy poziom HGF (czynnik wzrostu hepatocytów) mają niezależny, znamieny wpływ na aktywność choroby Leśniowskiego-Crohna w badanej przez autorów grupie młodzieży [235]. Autorzy czescy natomiast poszukiwali parametrów mających niezależny wpływ na ryzyko rozwoju powikłań u pacjentów z CD (m.in. zwężenia jelit, przetoki okołoodbytnicze, ropnie). Wykazali, że wśród analizowanych czynników: polimorfizm w pozycji -308 dla genu kodującego TNF- α oraz stężenie białka C-reaktywnego miały niezależny wpływ na ryzyko występowania wymienionych wyżej powikłań [244]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono podobnych doniesień dotyczących pacjentów z NZJ, które uwzględniałyby zachowanie się TGF- β 1 w osoczu oraz w wycinkach błony śluzowej jelit. W grupie badanych dzieci z NZJ (CD i UC) przeprowadzono więc analizę wieloczynnikową, poszukując parametrów mających niezależny związek z aktywnością tych schorzeń. W przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego stwierdzono, że stężenie białka C-reaktywnego, żelaza oraz wartość hematokrytu miały istotny, niezależny związek z aktywnością choroby. Natomiast w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna stwierdzono, że taki wpływ miała jedynie wartość hematokrytu. W przeprowadzonej analizie nie wykazano, aby poziom TGF- β 1 w osoczu czy jego ekspresja w wycinkach błony śluzowej jelit niezależnie wpływały na przebieg NZJ.

6.5. Polimorfizmy genu kodującego TGF- β 1 oraz innych wybranych cytokin

W ostatnich latach podnoszony jest problem ewentualnego wpływu polimorfizmów genów kodujących niektóre cytokiny na zapadalność i przebieg pewnych przewlekłych schorzeń [5, 17, 29, 39, 69, 80, 152, 195, 211, 262, 279]. Wobec udowodnionego udziału TGF- β 1 w patogenezie wielu stanów chorobowych, również mutacje dotyczące tej cytokiny były przedmiotem licznych badań. Zdecydowanie najwięcej doniesień analizuje wpływ polimorfizmu genu kodującego TGF- β 1 na przebieg oraz prognozowanie w schorzeniach, w których niekorzystnym zejściem jest włóknienie [12, 39, 69, 88, 139, 194, 242, 247, 266]. Wynika to z faktu, że właśnie TGF- β 1 jest głównym czynnikiem biorącym udział w modyfikowaniu macierzy pozakomórkowej (ECM) oraz w procesie fibrogenyzy. Najczęściej badanymi polimorfizmami są: w eksonie 1: w kodonie 10, w pozycji +869 substytucja tyminy na cytozynę (T869C) oraz w kodonie 25, w pozycji +915 substytucja guaniny na cytozynę (G915C); ponadto dwa polimorfizmy w rejonie promotorowym: w pozycji -800 substytucja guaniny na adeninę (G-800A) oraz w pozycji -509 zamiana cytozyny na tyminę (C-509T). Występowanie polimorfizmu w rejonie promotorowym może skutkować zmianą ilości produkowanego białka kodowanego przez dany gen. Ze względu na związek TGF- β 1 z procesem włóknienia m.in. u chorych z twardziną układową oceniano częstość występowania 6 polimorfizmów dla genu kodującego tę cytokinę. Nie wykazano związku między częstością któregośkolwiek z genotypów badanych polimorfizmów a występowaniem twardziny [137]. Podobnie *Bayat i wsp.* nie wykazali zależności między występowaniem 5 badanych polimorfizmów genu dla TGF- β 1 (w kodonach: 10, 25, 263 oraz w rejonie promotorowym: -509, -800) a ryzykiem ujawnienia się chorób zapalnych tkanki łącznej oraz skłonnością do powstawania bliznowców. Nie wykazano również różnic w stężeniu TGF- β 1 w osoczu między chorymi a grupą kontrolną [12]. W związku z tym, że niekorzystnym powikłaniem szeregu schorzeń nerek jest włóknienie, wielu autorów porusza ten problem także w aspekcie pacjentów nefrologicznych. Badania dotyczące analizy polimorfizmu w rejonie promotorowym w pozycji -509 genu dla TGF- β 1 przeprowadzone zostały w grupie 74 tajwańskich dzieci pozostających pod wieloletnią, regularną opieką medyczną z powodu wysokiego odpływu pęcherzowo-moczowodowego (OPM) (powyżej II stopnia). Chorych podzielono na dwie podgrupy: pierwszą stanowiły dzieci, u których rozpoznano przewlekłą niewydolność nerek (filtracja kłębuszkowa – GFR < 25 ml/min), drugą natomiast pacjenci z rozpoznaniem OPM, ale z prawidłową funkcją nerek. Wykazano, że w grupie dzieci z niedomogą nerek znamienne częściej obserwowano obecność dwóch zmutowanych alleli (-509T/T) niż u pozostałych pacjentów z OPM [139]. Także obserwacje *Cotton i wsp.* wskazują na częstsze występowanie homozygoty -509T/T u dzieci z zakażeniem układu moczowego, u których na podstawie badania scyntygraficznego wykazano zmiany bliznowate w obrębie nerek [39]. Podobnie wyniki badań u dzieci z zespołem Schönleina-Henocha wykazały cięższy przebieg schorzenia i większą częstość powikłań nerkowych u osób z tym genotypem w porównaniu z heterozygotami (-509C/T) oraz homozygotami dzikimi (-509C/C)

[279]. Wyniki powyższe wyraźnie podkreślają, że poważne powikłania ze strony nerek występują częściej u osób, u których występują dwa zmutowane allele w rejonie promotorowym w pozycji -509. Być może skutkiem tego jest w znacznym stopniu zwiększona produkcja TGF- β 1, co było obserwowane przez niektórych autorów właśnie u osobników homozygotycznych TT [76]. Wydaje się, że można tym tłumaczyć nasilenie procesów włóknienia w nerkach i szybszą progresję przewlekłej niewydolności nerek. Badania oceniające występowanie polimorfizmu dla genu kodującego TGF- β 1 w kodonie 10 w pozycji +869 u pacjentów dorosłych z zaawansowaną niewydolnością nerek wykazały, że u osobników, u których występowały jednocześnie powikłania kardiologiczne rzadziej obserwowano homozygotyczną postać genu zmutowanego C869C w porównaniu z pacjentami bez podobnych komplikacji [37]. Ciekawych danych dostarczyły badania *Patel i wsp.* u chorych z cukrzycą typu I. Wykazano bowiem korelację między obecnością polimorfizmu genu dla TGF- β 1 w pozycji +869 (kodon 10) a występowaniem nefropatii cukrzycowej u tych pacjentów. Podobnej zależności nie obserwowano w przypadku polimorfizmu w kodonie 25 i 263 [196]. W obserwacjach dotyczących przewlekłych schorzeń układu oddechowego wyniki są również niejednoznaczne. *Hienzmann i wsp.* nie wykazali różnicy w występowaniu poszczególnych polimorfizmów (C-509T i G915C) między dziećmi z astmą oskrzelową a grupą kontrolną [84]. Natomiast *Mak i wsp.* u 250 chińskich pacjentów z astmą oskrzelową stwierdzili, że obecność dwóch alleli zmutowanych w kodonie 10 (869C/C) oraz postać heterozygotyczna w rejonie promotorowym (-509C/T) predysponują do występowania astmy i nasilonej obturacji oskrzeli [152]. Ponadto w dużej grupie, ponad 800 pacjentów z mukowiscydozą wykazano, że obecność dwóch alleli zmutowanych w pozycji +869 (869C/C) w kodonie 10 korelowała z nasilonymi objawami ze strony układu oddechowego [52].

Zagadnienie polimorfizmu genu kodującego TGF- β 1 było także analizowane w aspekcie schorzeń hematologicznych. Nie wykazano zależności między poszczególnymi genotypami polimorfizmów: w rejonie promotorowym w pozycji -509 oraz w eksonie 1 w pozycji +869 a częstością występowania ostrej samoistnej małopłytkowości [6]. Podobnie *Gyulai i wsp.* nie stwierdzili wprawdzie, aby obecność polimorfizmu genu dla TGF- β 1 w kodonie 10 predysponowała do zachorowania na zespół mielodysplastyczny, jednak u homozygot dzikich (869T/T) obserwowali cięższy przebieg kliniczny choroby [80]. Podobne obserwacje dotyczące polimorfizmu w kodonie 10 oraz w kodonie 25 przedstawili *Mazur i wsp.* u 55 chorych z ziarnicą złośliwą. Autorzy wykazali bowiem, że genotypy związane z wyższą produkcją TGF- β 1 (869T/T, 869T/C oraz 915G/G i 915G/C) znamienne częściej towarzyszyły pozawązłowej lokalizacji choroby [162].

Wobec opisywanego udziału TGF- β 1 w patogenezie choroby trzewnej poszukiwano także tutaj ewentualnej zależności między obecnością polimorfizmów dla pewnych cytokin (w tym również TGF- β 1) a częstością występowania i przebiegiem tego schorzenia. Nie wykazano, aby polimorfizm genu kodującego TGF- β 1 w kodonie 10 czy polimorfizmy genów kodujących IL-10, IL-6, TNF- α i INF- γ miały wpływ na częstość jej występowania [273].

W związku z tak licznymi i jednocześnie kontrowersyjnymi doniesieniami na temat predyspozycji wynikającej z obecności polimorfizmów dla genu kodującego TGF- β 1 do

występowania oraz modyfikowania przebiegu wielu schorzeń, a jednocześnie pojedynczymi obserwacjami dotyczącymi dzieci z przewlekłymi stanami zapalnymi układu pokarmowego, w analizowanych grupach pacjentów podjęto próbę oceny powyższego zagadnienia. Badano cztery polimorfizmy: w eksonie 1, w kodonie 10 i 25 oraz dwa polimorfizmy w rejonie promotorowym: w pozycji -800 i w pozycji -509. We wszystkich grupach dzieci (NZJ, PZW) oceniono częstość występowania i dystrybucję poszczególnych genotypów dla badanych polimorfizmów genu kodującego TGF- β 1. Analizując całą populację 207 dzieci oraz poszczególne grupy (NZJ, PZW, K) wykazano, że w przypadku polimorfizmów: w kodonie 25, w pozycji +915 oraz w rejonie promotorowym, w pozycji -800 zdecydowanie dominował (prawie u 90% osób) genotyp homozygotyczny dziki (915G/G i -800G/G). Natomiast dla dwóch pozostałych polimorfizmów: w kodonie 10, w pozycji +869 oraz w rejonie promotorowym, w pozycji -509 nieco częstsze były postaci heterozygotyczne (869T/C i -509C/T). W analizie szczegółowej było to bardziej wyraźne w przypadku polimorfizmu w kodonie 10. Największą liczbę pacjentów z dwoma allelami zmutowanymi stwierdzono w przypadku polimorfizmu w kodonie 10 (869C/C) – u 21,7% badanych oraz u 17,5% w analizie polimorfizmu w rejonie promotorowym (-509T/T). Natomiast badając pozostałe dwa polimorfizmy, homozygoty z mutacją zidentyfikowano jedynie u 0,5% dzieci.

Szereg autorów oceniało dystrybucję poszczególnych polimorfizmów dla genu kodującego TGF- β w badanych populacjach. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki są podobne do stwierdzonych przez *Wang i wsp.*, którzy w 260 osobowej populacji kaukaskiej wykazali analogiczną częstość występowania osób heterozygotycznych oraz homozygot z mutacją w kodonie 25 (badania *Wang i wsp.* 15,4%, 0% – badania własne odpowiednio 12,6% i 0,5%) [266]. Porównywalny rozkład genotypów czterech, badanych także w przedstawianej pracy, polimorfizmów dla genu kodującego TGF- β wykazali autorzy niemieccy [69] oraz *Suzuki i wsp.*, analizując częstość polimorfizmu w kodonie 10 [242]. Natomiast *Zein i wsp.* oceniali występowanie polimorfizmów dla genów kodujących IL-10, TGF- β oraz TNF- α u przedstawicieli rasy kaukaskiej i Egipcjan w grupie pacjentów z PZW typu C oraz w grupie kontrolnej. Nie wykazali oni różnic etnicznych w dystrybucji polimorfizmów dla genów kodujących IL-10 oraz dla TGF- β w obrębie kodonu 10 i 25. Obserwowali natomiast taką zależność w przypadku polimorfizmu w rejonie promotorowym dla genu kodującego TNF- α w pozycjach -376 i -244. Ponadto w populacji egipskiej stwierdzili, że mutacja w pozycji -244 miała wyraźny związek z zapadalnością na HCV [282].

W badaniach własnych w grupie pacjentów z PZW nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w występowaniu poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów dla genu *TGF- β 1* w zależności od rozpoznania. Spostrzeżenia te są zgodne z doniesieniami *Suzuki i wsp.* dotyczącymi pacjentów z PZW typu C [242]. Również wyniki badań *Gewaltig i wsp.* są analogiczne z otrzymanymi w niniejszej pracy, poza polimorfizmem w kodonie 25. Autorzy wykazali bowiem wyłącznie w grupie kontrolnej występowanie homozygot z mutacją (915C/C), natomiast wśród chorych zdecydowanie dominowali osobnicy heterozygotyczni (915G/C) [69]. Badacze austriaccy poddali analizie grupę 149 chorych z hemochromatozą dziedziczną na podłożu mutacji C282Y, która stosunkowo rzadko prowadzi do rozwoju marskości wątroby. Wykazano znamienne

szybszą progresję choroby i nasilone włóknienie wątroby u pacjentów zidentyfikowanych jako heterozygoty (915G/C) bądź homozygoty z mutacją (915C/C) wobec genu kodującego TGF- β 1 w kodonie 25 w pozycji +915, traktując polimorfizm genu TGF- β 1 w tej pozycji jako niezależny czynnik ryzyka progresji włóknienia [194]. Spostrzeżenia powyższe są zgodne z doniesieniami autorów niemieckich, którzy stwierdzili, że genotyp heterozygotyczny (915G/C) związany jest ze zwiększonym ryzykiem nasilonego włóknienia wątroby u chorych z PZW typu C [69]. Odmienne wyniki badań dotyczące zależności postępu włóknienia wątroby od rodzaju polimorfizmu w pozycji +915 w grupie australijskich pacjentów z hemochromatozą przedstawili *Powell i wsp.* [205].

Badacze japońscy natomiast nie znaleźli w grupie 206 pacjentów z PZW typu C zależności między rodzajem polimorfizmu genu TGF- β w kodonie 10 w pozycji +869 a nasileniem włóknienia wątroby [242]. Przeciwnie wyniki zaprezentowali *Tag i wsp.*, wykazując wyraźną korelację między nasileniem włóknienia a obecnością dwóch zmutowanych alleli w kodonie 10 w pozycji +869 (869C/C) [247]. *Kimura i wsp.* na podstawie badań ponad 200-osobowej grupy chorych z PZW typu C wykazali, że u osobników heterozygotycznych i posiadających dwa allele dzikie w rejonie promotorowym w pozycji -509 szybciej dochodziło do zahamowania replikacji wirusa i jego eliminacji niż u osobników homozygotycznych z dwoma zmutowanymi allelami [115].

Wobec znanego niebezpieczeństwa powikłań onkologicznych u pacjentów zakażonych przewlekle wirusami hepatotropowymi (HBV i HCV) wielu autorów poszukiwało ewentualnej zależności między obecnością różnych polimorfizmów genu TGF- β a ryzykiem wystąpienia raka wątrobowokomórkowego (HCC). W dużej grupie zakażonych HBV (ponad 1000 osób) wykazano, że zarówno dla polimorfizmu w kodonie 10, jak i w rejonie promotorowym w pozycji -509 dwa allele zmutowane (869C/C i -509T/T) bądź formy heterozygotyczne (869T/C i -509C/T) występowały zdecydowanie rzadziej w chorych z HCC [114]. Podobnie *Magita i wsp.* na podstawie przeprowadzonych badań sugerują, że genotyp C869C związany jest ze znamienne niższym ryzykiem HCC [170]. Uważa się, że obecność alleli zmutowanych w kodonie 10 w pozycji +869 i rejonie promotorowym w pozycji -509 skutkuje podwyższoną produkcją TGF- β 1, czyli cytokiny o bardzo silnym działaniu immunosupresyjnym i antyproliferacyjnym i być może właśnie na tej drodze dochodzi m.in. do hamowania rozwoju nowotworu [250, 284]. Mogą za tym przemawiać badania *Grainger i wsp.* przeprowadzone w grupie 170 par bliźniąt. Autorzy wykazali, że obecności allelu T w przypadku polimorfizmu w rejonie promotorowym -509 towarzyszyło wyższe stężenie TGF- β 1 w osoczu, wartości wyższe obserwowano u osobników homozygotycznych pod względem zmutowanego genu (-509T/T) w porównaniu z osobami heterozygotycznymi (-509C/T) i homozygotami dzikimi (-509C/C). Sugeruje się więc, że poziom krążącego TGF- β 1 zależy m.in. od liczby alleli T [76].

Doniesienia na temat zależności między polimorfizmem genu dla TGF- β 1 dotyczące innych rodzajów nowotworów (m.in. raka sutka) czy gruczolaków i polipów jelit nie są jednoznaczne [133, 233, 284].

Dostępne doniesienia, nieliczne wprawdzie, na temat pacjentów z NZJ nie wskazują, podobnie jak w niniejszej pracy, na istnienie zależności między występowaniem różnych genotypów polimorfizmów genu TGF- β 1 a predyspozycją do wystąpienia tych schorzeń [29].

W całej grupie pacjentów z NZJ oraz w badanych podgrupach (CD i UC) nie stwierdzono również, aby częstość występowania jakiegokolwiek z badanych polimorfizmów genu kodującego TGF- β 1 miała wpływ na aktywność kliniczną choroby. *Hume i wsp.* wykazali jednak, że występowanie polimorfizmu w zakresie kodonu 10 może mieć związek z przebiegiem choroby Leśniowskiego-Crohna (predyspozycja do powstawania zwięźeń oraz częstsze wskazania do interwencji chirurgicznej) [88]. Także analiza polimorfizmów genów kodujących inne cytokiny (IL-10, TNF- α , IL- β , IL-1RN) w populacji tureckiej nie wykazała zależności między ich występowaniem a zapadalnością i przebiegiem NZJ [32]. *Cantor i wsp.* podkreślają związek między polimorfizmem genu kodującego IL-6 w pozycji -174 a lokalizacją zmian chorobowych u pacjentów z CD. U osób homozygotycznych (-174G/G) znacznie częściej występuje lokalizacja krętniczno-okrężnicza. Wykazano także, że u chorych właśnie z tym genotypem stwierdza się wyższe stężenia IL-6 we krwi, używając nawet określenia „high producer IL-6 genotype”. Obserwacje wskazują również, że poziom IL-6 może być elementem różnicującym między CD i UC, a także monitorującym przebieg choroby. Zwiększona ekspresja tej cytokiny, stwierdzana w wycinkach błony śluzowej niezmiennych w badaniu kolonoskopowym jelit, może stanowić czynnik ryzyka rozwoju NZJ w przyszłości [29]. Być może badania genetyczne wykonywane u pacjentów z niecharakterystycznymi objawami ze strony przewodu pokarmowego pozwolą wytypować osoby zagrożone chorobą Leśniowskiego-Crohna.

Dla wszystkich badanych w niniejszej pracy oraz w poszczególnych grupach i podgrupach chorych dzieci, nie wykazano zależności między nasileniem reakcji immunohistochemicznej na obecność TGF- β 1 w bioptatach błony śluzowej jelit i wątroby a częstością poszczególnych rodzajów analizowanych polimorfizmów. Podobnie, nie wykazano u tych chorych korelacji między stężeniem TGF- β 1 w osoczu oraz poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby a poszczególnymi genotypami badanych polimorfizmów. Podobne obserwacje dotyczące poziomu tej cytokiny w osoczu u chorych z PZW typu C w zależności od polimorfizmu genu *TGF- β 1* w kodonie 25 przedstawił *Gewaltig i wsp.* [69].

W ramach niniejszej pracy badano także, czy obecność któregośkolwiek z analizowanych polimorfizmów dla genu kodującego TGF- β miała wpływ na wyniki wybranych badań laboratoryjnych. Dla całej badanej grupy jedynie w przypadku polimorfizmu w rejonie promotorowym (-509) obserwowano taką zależność. U dzieci homozygotycznych pod względem genu zmutowanego (-509T/T) obserwowano wyższe poziomy białka C-reaktywnego (CRP) i większą liczbę płytek krwi w badaniu morfotycznym krwi w porównaniu z heterozygotami i homozygotami (-509C/T, -509C/C). Są to spostrzeżenia interesujące w związku z tendencją do podwyższonej liczby płytek krwi oraz wyższego stężenia CRP w przewlekłych stanach zapalnych. Być może u osobników homozygotycznych pod względem mutacji w rejonie promotorowym (-509T/T) proces chorobowy jest bardziej nasilony i ma tendencję do przewlekania się. Mogą za tym przemawiać obserwacje *Lee-Chen i wsp.* oraz *Yang i wsp.* dotyczące częstszego występowania poważnych powikłań u dzieci ze schorzeniami nefrologicznymi, u których odnotowano wyższą częstość tego genotypu [139, 279].

6.6. Wartości referencyjne transformującego czynnika wzrostu- β 1 we krwi (w osoczu lub w surowicy)

Zachowanie się poziomu TGF- β 1 w krążeniu (w osoczu lub w surowicy) w różnych stanach chorobowych, także w wieku rozwojowym, jest przedmiotem licznych badań. W związku z tym, że stężenie wielu cytokin jest zależne od wieku, ustalenie zakresu wartości referencyjnych jest szczególnie istotne w pediatrii, czyli w okresie dynamicznych zmian także w układzie immunologicznym [268, 218]. Dane na temat poziomu TGF- β 1 we krwi w populacji dzieci zdrowych są nieliczne i niejednoznaczne [210, 281]. W pojedynczych pracach poruszających tę problematykę nie obserwowano zależności poziomu tej cytokiny we krwi od płci badanych [189].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wzbogaciły więc nieliczne dane na temat wartości referencyjnych poziomu TGF- β 1 w osoczu w populacji dziecięcej. Poziom TGF- β w osoczu oceniono w grupie 167 dzieci: u 125 rozpoznawano przewlekły stan zapalny układu pokarmowego, natomiast 42 stanowiło grupę kontrolną. Dla całej badanej populacji nie wykazano zależności poziomu TGF- β w osoczu od wieku i płci badanych. Grupę kontrolną stanowiło 20 dziewcząt i 22 chłopców w wieku od 2 do 18 lat (średni wiek $11 \pm 5,0$ lat, mediana 11 lat), które nie otrzymywały żadnych leków i u których wykluczono procesy infekcyjne. Nie obserwowano korelacji poziomu TGF- β w osoczu z płcią (stężenie TGF- β w osoczu u dziewcząt było wyższe, ale nie była to różnica istotna statystycznie) i wiekiem badanych, co jest zgodne ze spostrzeżeniami innych badaczy [189, 281]. Odmienne obserwacje na temat wpływu wieku na poziom TGF- β w surowicy przedstawili *Okamoto i wsp.* oraz *Rosensweig i wsp.*, odnotowując ujemną korelację poziomu tej cytokiny we krwi z wiekiem badanych [189, 210]. Być może niezgodność wyników uzyskanych przez tych badaczy z otrzymanymi w przedstawianej pracy jest rezultatem znacznej różnicy średniego wieku między badanymi grupami dzieci (praca własna – $11 \pm 5,0$ lat, grupa analizowana przez autorów japońskich – $5,2 \pm 3,8$ lat) [189]. Należy podkreślić również, że większość autorów analizowała poziom TGF- β oznaczany w surowicy [189, 218]; a nie – jak w badaniach *Rosensweig i wsp.* oraz w przedstawianej pracy – w osoczu [210]. Szereg doniesień podkreśla różnicę stężenia TGF- β oznaczanego w surowicy i w osoczu, tłumacząc to przede wszystkim udziałem płytek krwi, które są bardzo istotnym źródłem TGF- β 1 [75, 263]. *Junker i wsp.* oceniając u tych samych pacjentów jednocześnie w osoczu i w surowicy poziom TGF- β 1, wykazali, że stężenie tej cytokiny w surowicy było znacznie wyższe. W grupie kontrolnej różnica wynosiła 39 ng/ml, natomiast u pacjentów z rakiem nerki aż 139 ng/ml. Podkreślenia wymaga fakt, że u chorych onkologicznych nie obserwowano w tym czasie zwiększonej liczby płytek krwi, co mogłoby ewentualnie, chociaż częściowo, tłumaczyć tak dużą różnicę [102]. Podnoszony jest także problem różnic poziomu TGF- β 1 w osoczu w zależności od metody, jaką oznaczano stężenie tej cytokiny, a nawet od sposobu pobrania i preparowania próbek krwi. Grupa autorów brytyjskich wykazała istotne różnice w poziomie TGF- β 1, porównując wyniki uzyskane u tych samych osób, gdy jedynym kryterium różnicującym powyższe grupy był sposób pobrania krwi. Materiał biologiczny został pobrany standardowo oraz

w warunkach minimalizujących aktywację płytek krwi (brak opaski uciskowej, większy przekrój igły, nie korzystano z próbek próżniowych w celu wyeliminowania urazu spowodowanego podciśnieniem, używano schłodzonych próbek z EDTA). Pozostałe elementy takie jak: preparowanie próbki krwi, warunki wirowania, przechowywanie oraz sama procedura oznaczania były identyczne. Wykazano, że u 8 na 10 osób, którym pobrano krew stosując ww. warunki, poziom TGF- β 1 w osoczu był nieoznaczalny (<100 pg/ml), natomiast w przypadku, gdy materiał biologiczny pobrano w sposób tradycyjny, średnie stężenie tej cytokiny wynosiło 7,7 ng/ml (5,87-13,64 ng/ml) [40]. W celu szczegółowej oceny wpływu płytek krwi na wynik pomiaru TGF- β 1 w surowicy krwi bądź w osoczu, obok stężenia tej cytokiny badano również markery degranulacji trombocytów, przede wszystkim czynnik płytkowy 4 (*platelet factor 4* – PF-4) świadczący o aktywacji tego procesu *ex vivo*. Poziom TGF- β 1 oceniany bez uwzględnienia efektów degranulacji płytek krwi był wyższy niż po jego korekcji na podstawie stężenia PF-4 (4,3 \pm 1,4 ng/ml vs. 3,7 \pm 1,4 ng/ml). Autorzy wykazali również znaczne różnice między poziomem TGF- β 1 ocenianym w surowicy i w osoczu (odpowiednio 84,1 \pm 32,4 ng/ml i 4,1 \pm 2,0 ng/ml). Ponadto na podstawie wyników uzyskanych w grupie kontrolnej potwierdzili także, że u ludzi zdecydowanie dominuje właśnie izoforma TGF- β 1 (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 odpowiednio poziomy w osoczu – 4,1 \pm 2,0 ng/ml, <0,2 ng/ml, <0,1 ng/ml) [264].

Wobec przedstawionych powyżej spostrzeżeń konieczna jest duża ostrożność w interpretowaniu wyników poziomu TGF- β 1 we krwi obwodowej. W aspekcie pediatrycznym, poza zagadnieniami czysto metodologicznymi, istotna jest sama procedura pobierania krwi, zwłaszcza u małych dzieci. Wielokrotnie praktycznie niemożliwe jest całkowicie nieurazowe uzyskanie materiału biologicznego, a więc wyeliminowanie jednego z ważnych czynników mogących modyfikować poziom TGF- β 1 we krwi.

Należy również podkreślić, że wielu autorów poczyniło interesujące obserwacje, oceniając poziom TGF- β 1 w moczu w przewlekłych schorzeniach układu moczowego i pokarmowego, głównie w PZW [55, 74, 85, 230, 257, 258]. Powyższe doniesienia skłaniają do rozważenia oceny TGF- β 1 w moczu, jako markera monitorującego przebieg przewlekłych stanów zapalnych. Wymaga to z pewnością szerokich badań w różnych grupach chorób. Niekwestionowaną zaletą powyższego badania jest jego całkowita nieinwazyjność, a więc możliwość wielokrotnego powtarzania, także u dzieci.

6.7. Podsumowanie

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano się z tak wszechstronną i kompleksową oceną zachowania się poszczególnych cytokin, w tym także TGF- β 1, jak w niniejszej pracy. W przedstawianej pracy analizowano zarówno poziom TGF- β 1 w osoczu, jak i jego tkankową ekspresję ocenianą badaniem immunohistochemicznym oraz metodami biologii molekularnej, wykrywając obecność i oznaczając poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Technika odwrotnej transkrypcji połączona z PCR w czasie rzeczywistym jest obecnie najdo-

kładniejszą i obarczoną najmniejszym błędem metodą ilościowego oznaczania specyficznych transkryptów. Inne metody określania ilości RNA opierają się głównie na wykrywaniu poszczególnych transkryptów za pomocą hybrydyzacji ze specyficznymi znakowanymi sondami, co skutkuje zarówno brakiem precyzji przy pomiarze ilościowym (np. za pomocą densytometrii, obraczonej zwykle stosunkowo dużym błędem pomiaru), jak i prostą proporcjonalnością pomiędzy wielkością sygnału a faktyczną ilością badanego transkryptu jedynie w pewnym, niekiedy dość wąskim, zakresie stężeń [124].

W celu oceny ewentualnego wpływu czynników genetycznych na przebieg omawianych schorzeń, w badanych grupach dzieci oznaczono dodatkowo również cztery najczęściej opisywane polimorfizmy genu kodującego TGF- β 1. Doniesienia dotyczące wykorzystania tych metod w ocenie TGF- β 1 są nieliczne, zwłaszcza w populacji dziecięcej i pochodzą z ostatnich lat [39, 84, 279].

Badana grupa dzieci z przewlekłymi zapaleniami wątroby była nieliczna i poszczególne schorzenia były reprezentowane w niewielkiej liczbie przypadków. Wydaje się jednak, że otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia z piśmiennictwa, iż pomiar TGF- β 1, zwłaszcza w materiale tkankowym uzyskanym drogą biopsji, ma istotne znaczenie głównie w ocenie nasilenia włóknienia. U dzieci zazwyczaj (także w niniejszej pracy), zwłaszcza w PZW o etiologii wirusowej, obserwuje się stosunkowo niewielkie nasilenie włóknienia. Prawdopodobnie w związku z tym nie wykazano istotnych różnic w stężeniu TGF- β 1 w osoczu oraz jego ekspresji w tkance zarówno w badaniu immunohistochemicznym, jak i w pomiarze poziomu mRNA genu *TGF- β 1*. Nie tylko nasilenie włóknienia, ale i dynamika tego procesu jest zwykle u dzieci nieduża, wobec tego ewentualne badania kontrolne (porównawcze) należałoby wykonywać po upływie minimum 1-2 lat. Trzeba również pamiętać, że biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym, obciążonym możliwością licznych powikłań, a ilość uzyskanego materiału tkankowego jest ograniczona. W związku z tym nie jest to metoda diagnostyczna wielokrotnie powtarzana i wykonuje się ją jedynie w przypadkach ścisłych wskazań. Wydaje się więc, że nawet kompleksowa ocena TGF- β 1 w PZW u dzieci ma ograniczoną wartość jako metoda diagnostyczna i monitorującą przebieg choroby oraz wyniki leczenia. Mając świadomość, że wyniki dotyczące tej grupy dzieci w przedstawianych badaniach mają ograniczoną wartość (przede wszystkim wynikającą z niewielkiej liczebności grup chorych oraz braku kontrolnej biopsji wątroby) zdecydowano się na ich przedstawienie wobec bardzo nielicznych bądź nawet braku (badania molekularne) informacji w dostępnym piśmiennictwie na ten temat w populacji dziecięcej.

Zasadniczą grupą chorych analizowaną w niniejszej pracy były dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. W dostępnym piśmiennictwie zagadnienia związane z NZJ i zachowaniem się TGF- β 1, szczególnie w aspekcie klinicznym, są zdecydowanie mniej liczne niż dotyczące PZW. Niewielu autorów zwłaszcza analizuje ten problem w populacji pediatrycznej. W związku z tym w przedstawianej pracy oceniano wszechstronnie zachowanie się transformującego czynnika wzrostu β 1. Podkreślenia wymaga przede wszystkim fakt łatwiejszej dostępności materiału tkankowego, w związku z planowo wykonywanymi, kontrolnymi badaniami endoskopowymi oraz szansa jednoczesowej oceny wyćinków błony śluzowej jelit reprezentujących różny stopień miejscowego zaawansowa-

nia choroby. Ponadto dynamika przebiegu NZJ jest zwykle inna niż w przypadku PZW, co daje możliwości powtarzania badań i porównywania wyników u tych samych chorych w stosunkowo niedługim czasie. Otrzymane wyniki badań dostarczyły wielu interesujących danych szczególnie u pacjentów, u których oznaczenia wykonano w różnych okresach choroby, głównie w zakresie badań molekularnych oceniających poziom mRNA genu *TGF-β1* w wycinkach jelit. Ważne informacje uzyskano również badając porównawczo poziom mRNA genu *TGF-β1* w bioptatach błony śluzowej jelit pobranych w aktywnym okresie NZJ z obszarów ocenionych endoskopowo jako prawidłowe i jako zmienione chorobowo. Wykazano wyraźnie wyższy poziom mRNA genu kodującego tę cytokinę w tkankach makroskopowo zmienionych. Szczególnie ważne wydaje się porównanie u tych samych chorych poziomu mRNA genu *TGF-β1* w tkance pobranej w czasie remisji oraz w okresie aktywnym choroby, ale z miejsc ocenionych jako niezmiennione w badaniu endoskopowym. Znamienne wyższy poziom mRNA genu dla tej cytokiny w materiale tkankowym z miejsca niezmiennionego, ale w aktywnym okresie choroby w porównaniu z wynikami uzyskanymi w remisji, może świadczyć o bardziej uogólnionym procesie zapalnym niż wskazywałoby na to badanie endoskopowe. Biorąc jednocześnie pod uwagę fakt, że u tych pacjentów stwierdzono także różnice w poziomie TGF-β1 w osoczu w różnych okresach choroby, można mieć nadzieję, że właśnie ta cytokina będzie traktowana w przyszłości jako ważny marker dostarczający informacji na temat przebiegu i zasięgu zmian w NZJ.

Należy jednak pamiętać, że do pełnej oceny działania TGF-β1 niezbędne jest zbadanie wszystkich elementów uczestniczących w prawidłowej jego syntezie, aktywacji oraz przekazywaniu sygnału do komórki oraz w jej wnętrzu. Szereg doniesień podkreśla możliwość zaburzeń na poziomie receptorów dla tej cytokiny, białek biorących udział w jego aktywacji czy nieprawidłowości w zakresie układu białek przekazujących/hamujących sygnał wewnątrzkomórkowo (białka z rodziny Smad). Potwierdzają to między innymi badania *Monteleone i wsp.*, w których zablokowanie białka Smad7 za pomocą specyficznych antysensownych oligonukleotydów skutkowało zahamowaniem na drodze TGF-β1/Smad3-zależnej produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α czy IFN-γ, prowadząc do ograniczenia nasilenia procesu zapalnego. Udowodniono bowiem, że u chorych z NZJ stwierdza się nadprodukcję białka Smad7, czemu towarzyszy obniżona fosforylacja białka Smad3 [173]. Badania ostatnich lat zwracają uwagę również na fakt, iż w kompleksowej analizie różnych cytokin, w tym TGF-β1, należy brać pod uwagę także czynniki genetyczne. Wśród nich wymienia się, obok analizowanych w niniejszej pracy polimorfizmów samego genu kodującego TGF-β1, także mutacje dotyczące genów kodujących: białka biorące udział w jego aktywacji, receptory czy białka z rodziny Smad [13, 82, 83, 173, 190].

Być może wszechstronne badanie nie jednej, wybranej cytokiny, ale całego profilu cytokin uczestniczących w patogenezie omawianych przewlekłych stanów zapalnych układu pokarmowego, pozwoliłoby na wyciągnięcie bardziej ogólnych wniosków.

Badania podjęte w niniejszej pracy oraz doniesienia w piśmiennictwie analizujące czynniki, które uczestniczą w patogenezie przewlekłych stanów zapalnych mają na celu z jednej strony bardziej wnikliwe poznanie natury tych schorzeń i poszuki-

wanie ewentualnych parametrów monitorujących ich przebieg, z drugiej zaś strony wskażą być może nowe kierunki terapii.

Ponad 30 lat temu opisano pierwsze próby leczenia interferonem pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. Druga połowa lat 80-tych i lata 90-te ubiegłego wieku dostarczyły licznych doświadczeń w tej dziedzinie. Obecnie interferon jest nadal podstawowym lekiem stosowanym w przewlekłych wirusowych zapaleniach wątroby. Interferon- α (IFN- α) jest rekombinowaną formą cytokiny normalnie produkowanej przez zakażony ustrój w odpowiedzi na infekcję wirusową. Ma on działanie immunomodulujące, przeciwwirusowe, antyproliferacyjne oraz hamuje włóknienie. Te wielokierunkowe funkcje IFN- α zapoczątkowane są związaniem się tej cytokiny z receptorem znajdującym się w błonie komórkowej i inicjują szereg efektów wewnątrzkomórkowych. Działanie immunomodulujące jest wynikiem indukowanej poprzez IFN- α ekspresji kompleksu antygenów zgodności tkanekowej, nasilonej fagocytozy i litycznego działania cytotoksycznych limfocytów T, prowadzących do eliminowania zakażonych hepatocytów. Aktywność przeciwwirusowa IFN- α polega przede wszystkim na hamowaniu wnikania wirusa do komórki [154]. W badaniach doświadczalnych, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, oceniano wpływ terapii blokującej działanie TGF- β na proces włóknienia wątroby w przebiegu różnych przewlekłych jej schorzeń. Efekty powyższe osiągnano m.in. poprzez stosowanie specyficznych przeciwciał, dekoryny czy też działających antagonistycznie cytokin. Obserwowano zahamowanie aktywności komórek gwiazdzistych w wątrobie skutkujące zmniejszeniem nasilenia włóknienia tego narządu [26].

Ostatnie lata, dzięki głębszemu poznaniu patogenez, przyniosły szereg propozycji leczenia biologicznego pacjentów z NZJ. Układ immunologiczny błony śluzowej zajmuje centralne miejsce w rozwoju procesu zapalnego i uszkodzenia w obrębie jelit. Logiczną konsekwencją tego faktu jest poszukiwanie właśnie na tym polu nowych opcji terapeutycznych [3]. Lekiem o udowodnionej już skuteczności w terapii choroby Leśniowskiego-Crohna są przeciwciała monoklonalne IgG, neutralizujące prozapalną cytokinę, jaką jest TNF- α (*infliximab*). Od 1998 roku został on zaakceptowany do leczenia CD o średnim i ciężkim przebiegu. Dzięki swoim właściwościom lek ten znajduje zastosowanie także w innych schorzeniach, w przebiegu których udowodniono udział tej cytokiny, m.in. u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [213].

Obok przeciwciał monoklonalnych przeciw TNF- α kontynuowane są badania nad wdrożeniem w NZJ innych form terapii biologicznej. Mimo braku jednoznacznego zdefiniowania czynnika/czynników etiologicznych, dzięki wykorzystaniu wiedzy na temat mechanizmów immunologicznych biorących udział w ich patogenezie można wytyczać nowe kierunki leczenia. Zasadniczym elementem proponowanych nowych form terapii jest, tak jak w przypadku TNF- α , hamowanie nadmiernej aktywności pewnych elementów układu immunologicznego nasilających proces zapalny bądź stymulowanie tych czynników, które mają działanie przeciwzapalne.

Badania koncentrują się w wokół kilku zagadnień. Z jednej strony duże nadzieje wiązano z hamowaniem aktywacji komórek T poprzez m.in. próby stosowania humanizowanych przeciwciał monoklonalnych przeciw ligandowi CD40 oraz przeciwciał redukujących liczbę komórek CD4. Jednak ze względu na niebezpieczeń-

stwo powikłań zakrzepowych (przeciwciała monoklonalne przeciw ligandowi CD40) oraz wobec CD4-zależnej limfopenii próby powyższe zostały aktualnie wstrzymane. Natomiast trwają badania nad zastosowaniem w sterydoopornym UC o ciężkim przebiegu humanizowanych przeciwciał monoklonalnych przeciw CD3, które selektywnie indukują apoptozę aktywowanych komórek T. Wyniki badań są obiecujące, natomiast z działań ubocznych obserwowano jedynie przejściowe obniżenie liczby limfocytów T oraz typowe objawy związane z działaniem cytokin [3].

Kolejna grupa badań koncentruje się na próbach wykorzystania przeciwzapalnego działania niektórych cytokin. Zaawansowane były prace nad pozajelitowym zastosowaniem IL-10 w opornych na leczenie NZJ, głównie CD. Hamuje ona bowiem m.in. produkcję cytokin przez limfocyty Th1 (dominująca odpowiedź w CD), głównie: IFN- γ , TNF- α i IL-2 oraz powstawanie limfocytów Th1 pobudzonych przez antygen, stymuluje natomiast wzrost i różnicowanie aktywowanych limfocytów B i T, wytwarzanie antagonisty receptora IL-1 oraz aktywuje komórki NK [72]. Mimo wstępnych, pozytywnych wyników, wydaje się jednak, że dożylna lub podskórna podaż IL-10 nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Prowadzone obecnie badania na zwierzętach nad miejscowym (doustnym lub doodbytniczym) jej zastosowanie przynoszą bardziej obiecujące wyniki. W kręgu zainteresowań badaczy jest również ewentualne wykorzystanie przeciwzapalnego działania IL-11, zwłaszcza u pacjentów, którzy nie otrzymują sterydów obniżających jej efektywność [3]. Wobec obiecujących wyników zastosowania przeciwciał przeciw TNF- α w leczeniu CD, wiele badań koncentruje się na hamowaniu (blokowaniu) także innych cytokin prozapalnych. Dotyczą one m.in. inhibitorów dla receptorów aktywowanych przez czynniki proliferacji peroksysomów (*peroxisome proliferator-activated receptors* – PPARs) czy IL-6, gdzie u pacjentów z CD wykazano znamienne wyższy odsetek remisji w porównaniu z grupą otrzymującą placebo [3]. Wśród czynników biologicznych hamujących polaryzację komórek Th1 szereg daje nadzieje na wykorzystanie ich w leczeniu pacjentów z NZJ. Wśród nich wymienia się przeciwciała wobec receptora dla IL-2 (anty-IL-2R), która jest z jednym z kluczowych mediatorów w chorobach autoimmunologicznych i zwiększone jej stężenie może korelować z nasileniem autoagresji. Badania dotyczą również przeciwciał monoklonalnych przeciw IL-12, IL-18 czy IFN- γ . Odłąbną dziedziną zainteresowań są inhibitory cząsteczek adhezyjnych (integryn): rekombinowane, humanizowane przeciwciała monoklonalne przeciw łańcuchowi $\alpha 4$ integrzyn czy przeciwciała przeciw receptorowi $\alpha 4\beta 7$, które wybiórczo hamują przyleganie leukocytów do błony śluzowej przewodu pokarmowego [3]. Próby kliniczne dotyczą również zastosowania czynników wzrostu, m.in. ludzkiego hormonu wzrostu (HGH – *human growth hormone*), wykorzystując jego działanie ograniczające procesy kataboliczne towarzyszące zwykłe NZJ, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) czy nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) [3].

Być może w przyszłości także transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- $\beta 1$) produkowany m.in. przez komórki Th3 i hamujący na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego różnicowanie natywnych komórek Th w Th1 oraz Th2, znajdzie miejsce nie tylko w monitorowaniu przebiegu przewlekłych stanów zapalnych, ale również i w terapii tych schorzeń.

7. Wnioski

1. Wydaje się, że w populacji dziecięcej stężenie TGF- β 1 w osoczu nie może być wykorzystane jako jeden z elementów diagnozujących i różnicujących przewlekłe stany zapalne układu pokarmowego (NZJ i PZW).
2. Poziom TGF- β 1 w osoczu nie może być również wykorzystywany jako marker aktywności klinicznej choroby czy nasilenia zmian zarówno endoskopowych, jak i histopatologicznych w błonie śluzowej jelita u chorych z NZJ. Natomiast u pacjentów z PZW nie odzwierciedla aktywności zapalnej ani nasilenia włóknienia w tkance wątrobowej – co może wynikać z niewielkiego nasilenia włóknienia obserwowanego u dzieci.
3. Wydaje się, że miejscowa ekspresja TGF- β 1 oceniana w wycinkach błony śluzowej jelit oraz w wątrobie u chorych z NZJ i PZW metodą immunohistochemiczną nie powinna być traktowana jako jeden z czynników różnicujących ani monitorujących przebieg NZJ i PZW u dzieci.
4. Ocena poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) jest wartościowym badaniem pozwalającym na dokładne określenie zasięgu zmian chorobowych w obrębie jelit.
5. Kontrolne (powtarzane) badania stężenia TGF- β 1 w osoczu oraz poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit, przeprowadzane u poszczególnych chorych z NZJ mogą być wykorzystywane do prognozowania u nich przebiegu schorzenia.
6. U dzieci z PZW analiza poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), nie wydaje się być badaniem przydatnym w różnicowaniu i ocenie nasilenia zmian morfologicznych.
7. Analizowane polimorfizmy genu kodującego TGF- β 1 nie wpływają na występowanie i przebieg kliniczny badanych przewlekłych stanów zapalnych układu pokarmowego u dzieci.
8. Wobec stosunkowo niewielkiej liczebności analizowanych grup, szczególnie pacjentów z PZW, wskazane wydaje się przeprowadzenie analogicznych, kompleksowych badań w większych populacjach pacjentów z przewlekłymi schorzeniami zapalnymi układu pokarmowego.
9. Na podstawie badań przeprowadzonych w grupie kontrolnej ustalono wartości referencyjne stężenia TGF- β 1 w osoczu. Nie stwierdzono zależności poziomu TGF- β 1 w osoczu od wieku i płci badanych.

8. Streszczenie

Wśród czynników zaangażowanych w utrzymanie homeostazy immunologicznej w organizmie i związane z tym procesy wzrostu i dojrzewania, istotną rolę przypisuje się transformującemu czynnikowi wzrostu beta 1 (TGF- β 1). Można wyodrębnić dwie podstawowe sfery jego aktywności biologicznej. Pierwsza z nich, to wpływ na procesy proliferacji i różnicowania komórek, druga natomiast to silne działanie immunomodulacyjne. Szereg schorzeń może wynikać zarówno z niedostatecznej, jak i nadmiernej aktywności biologicznej TGF- β 1. Interesujący jest więc udział tej cytokiny w etiopatogenezie i przebiegu przewlekłych stanów zapalnych, w tym przede wszystkim nieswoistych zapaleń jelit oraz przewlekłych zapaleń wątroby szczególnie w wieku rozwojowym. Najnowsze dane z piśmiennictwa zwracają również uwagę na możliwą zależność między polimorfizmem genu kodującego TGF- β 1 a zapadalnością na niektóre przewlekłe schorzenia bądź modyfikowaniem ich przebiegu. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień dotyczących zarówno dzieci, jak i dorosłych z przewlekłymi stanami zapalnymi, obejmujących kompleksową ocenę TGF- β 1: jego poziomu we krwi, ekspresji w zmienionych chorobowo tkankach oraz ewentualnej zależności występowania oraz przebiegu tych schorzeń od polimorfizmu genu kodującego tę tak wszechstronnie działającą cytokinę.

Głównym celem podjętych badań była próba oceny, w jakim stopniu w patogenezie przewlekłych stanów zapalnych układu pokarmowego u dzieci: nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) i przewlekłych zapaleń wątroby (PZW) uczestniczy TGF- β 1, a także próba ustalenia, czy oznaczanie zawartości tej cytokiny we krwi i/lub w tkance może być pomocne w rozpoznawaniu, ocenie aktywności i stopnia zaawansowania oraz w monitorowaniu przebiegu tych schorzeń.

Dodatkowym zamierzeniem pracy było ustalenie na podstawie wyników badania grupy kontrolnej wartości referencyjnych stężenia TGF- β 1 w osoczu u dzieci.

Badaniami objęto 167 dzieci w wieku od 1,5 do 18,4 lat (97 chłopców oraz 70 dziewcząt). W analizowanej grupie było:

- 104 pacjentów z rozpoznaniem nieswoistych zapaleń jelit (NZJ): 36 dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) i 68 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC),
- 21 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (PZW): 10 dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (HBV), 4 dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV) oraz 7 dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH),
- 42 dzieci stanowiło grupę kontrolną (K).

W tym celu badano:

- w osoczu stężenie TGF- β 1,
- w tkance (w błonie śluzowej jelita – u dzieci z NZJ oraz w tkance wątrobowej – u dzieci z PZW):
 - zawartość TGF- β 1 metodą immunohistochemiczną (IHC),
 - poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

Ponadto analizując 4 polimorfizmy dla genu kodującego TGF- β 1 (dwa w eksonie 1: kodon 10 w pozycji +869 i kodon 25 w pozycji +915 oraz dwa w rejonie promotorym w pozycjach -800 i -509) badano ewentualny udział czynników genetycznych w modyfikowaniu zawartości TGF- β 1 w osoczu i w tkankach oraz ich wpływ na przebieg NZJ i PZW.

Analizowane grupy oraz podgrupy dzieci nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku oraz płci. W grupie chorych z NZJ współczynnik BMI nie różnił się między chorymi z UC i CD, natomiast wartość współczynnika Cole'a była wyższa w grupie pacjentów z UC. Wśród analizowanych objawów klinicznych u chorych z NZJ wykazano, że obecność krwi w stolcu znamiennej częściej stwierdzano u chorych z UC w porównaniu z pacjentami z CD.

Nie wykazano istotnej statystycznie zależności stężenia TGF- β 1 w osoczu od: wieku i płci badanych, rozpoznania oraz u pacjentów z NZJ od stopnia aktywności choroby (ocenianych w odpowiednich skalach), nasilenia zmian endoskopowych i histopatologicznych w wycinkach błony śluzowej jelit. Natomiast u pacjentów z NZJ, u których badanie wykonano dwukrotnie (w aktywnym okresie choroby oraz w czasie remisji), wykazano znamiennej wyższe stężenia TGF- β 1 w osoczu w aktywnej fazie choroby w porównaniu z wynikami uzyskanymi w remisji oraz w grupie kontrolnej. Stężenie to nie różniło się istotnie statystycznie między badaniami wykonanymi w okresie remisji choroby u dzieci z NZJ i w grupie kontrolnej. U chorych z PZW nie stwierdzono zależności między poziomem TGF- β 1 w osoczu a aktywnością zapalną czy nasileniem włóknienia w wycinkach wątroby.

Analizując poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit i wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR) u chorych z NZJ stwierdzono statystycznie wyższe poziomy mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit pobranych w aktywnym okresie choroby z miejsc ocenionych w badaniu kolonoskopowym jako zmienione chorobowo w porównaniu z wynikami uzyskanymi w wycinkach niezmienionej błony śluzowej jelit oraz w grupie kontrolnej. Natomiast u pacjentów z NZJ, u których badanie wykonano dwukrotnie (aktywny okres choroby i remisja) w aktywnym okresie choroby stwierdzono znamiennej statystycznie wyższy poziom mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit ocenionych w badaniu kolonoskopowym zarówno jako zmienione chorobowo, jak i prawidłowe w porównaniu z poziomem u tych samych chorych w czasie remisji choroby oraz u dzieci w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono natomiast różnicy między poziomami mRNA genu kodującego TGF- β 1 uzyskanymi u chorych w okresie remisji a grupą kontrolną.

U chorych z NZJ nie obserwowano różnic w nasileniu reakcji immunohistochemicznej (IHC) na obecność TGF- β 1 w badanych wycinkach błony śluzowej jelit w zależności od aktywności choroby, stężenia TGF- β 1 w osoczu, poziomu mRNA genu kodującego tę cytokinę czy wyników badania kolonoskopowego i histopatologicznego wycinków błony śluzowej jelit. U chorych z PZW nie wykazano także zależności reakcji IHC od aktywności zapalnej i nasilenia włóknienia w biopsjach wątroby.

Analizując wpływ czynników genetycznych nie stwierdzono zależności między poszczególnymi genotypami badanych polimorfizmów dla genu *TGF- β 1* a występowania

niem NZJ i PZW, ich przebiegiem klinicznym, stężeniem TGF- β 1 w osoczu, poziomem mRNA genu kodującego TGF- β 1 oraz nasileniem reakcji immunohistochemicznej (IHC) na obecność TGF- β 1 w wycinkach jelit i wątroby.

Analiza wieloczynnikowa przeprowadzona u chorych z CD wykazała statystycznie istotny, niezależny związek wartości hematokrytu z aktywnością choroby jako zmienną zależną. Natomiast u pacjentów z UC obserwowano statystycznie istotny, niezależny związek poziomu żelaza, białka C-reaktywnego w surowicy oraz wartości hematokrytu z aktywnością choroby jako zmienną zależną.

W oparciu o uzyskane wyniki wysunięto następujące wnioski:

1. Wydaje się, że w populacji dziecięcej stężenie TGF- β 1 w osoczu nie może być wykorzystane jako jeden z elementów diagnozujących i różnicujących przewlekłe stany zapalne układu pokarmowego (NZJ i PZW).
2. Poziom TGF- β 1 w osoczu nie może być również wykorzystywany jako marker aktywności klinicznej choroby czy nasilenia zmian zarówno endoskopowych, jak i histopatologicznych w błonie śluzowej jelita u chorych z NZJ. Natomiast u pacjentów z PZW nie odzwierciedla aktywności zapalnej ani nasilenia włóknienia w tkance wątrobowej – co może wynikać z niewielkiego nasilenia włóknienia obserwowanego u dzieci.
3. Wydaje się, że miejscowa ekspresja TGF- β 1 oceniana w wycinkach błony śluzowej jelit oraz w wątrobie u chorych z NZJ i PZW metodą immunohistochemiczną nie powinna być traktowana jako jeden z czynników różnicujących ani monitorujących przebieg NZJ i PZW u dzieci.
4. Ocena poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit u pacjentów z NZJ metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR) jest wartościowym badaniem pozwalającym na dokładne określenie zasięgu zmian chorobowych w obrębie jelit.
5. Kontrolne (powtarzane) badania stężenia TGF- β 1 w osoczu oraz poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach błony śluzowej jelit, przeprowadzane u poszczególnych chorych z NZJ mogą być wykorzystywane do prognozowania u nich przebiegu schorzenia.
6. U dzieci z PZW analiza poziomu mRNA genu kodującego TGF- β 1 w wycinkach wątroby metodą odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR), nie wydaje się być badaniem przydatnym w różnicowaniu i ocenie nasilenia zmian morfologicznych.
7. Analizowane polimorfizmy genu kodującego TGF- β 1 nie wpływają na występowanie i przebieg kliniczny badanych przewlekłych stanów zapalnych układu pokarmowego u dzieci.
8. Wobec stosunkowo niewielkiej liczebności analizowanych grup, szczególnie pacjentów z PZW, wskazane wydaje się przeprowadzenie analogicznych, kompleksowych badań w większych populacjach pacjentów z przewlekłymi schorzeniami zapalnymi układu pokarmowego.
9. Na podstawie badań przeprowadzonych w grupie kontrolnej ustalono wartości referencyjne stężenia TGF- β 1 w osoczu. Nie stwierdzono zależności poziomu TGF- β 1 w osoczu od wieku i płci badanych.

9. Summary

Transforming growth factor – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) is known to play a key role in the immunological homeostasis of the organism and related processes of growth and maturation. This pleiotropic cytokine has a number of different biological activities. It is linked to cell proliferation and differentiation, but it also plays an important role in modulating the immune response. Disease may arise both from excessive and insufficient activity of this cytokine. TGF- $\beta 1$ involvement in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases in children such as inflammatory bowel disease and chronic hepatitis seems especially interesting. In this respect the role of *TGF- $\beta 1$* gene polymorphisms in the incidence and modification of the clinical course of these diseases has been recently evaluated. However, in the literature we have not found reports on the role of TGF- $\beta 1$ in adult patients or children with chronic inflammatory diseases, assessing its plasma level, tissue expression and genotype and its relation to the disease course.

The main aim of the study was to evaluate the role of TGF- $\beta 1$ in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases of the digestive system in children e.g. inflammatory bowel diseases (IBD) and chronic hepatitis (Ch.h.) and to assess whether TGF- $\beta 1$ level in plasma or tissue expression can be useful in diagnosing and monitoring of clinical course of these diseases. Additionally, based on the results of TGF- $\beta 1$ level in plasma in the control group, we aimed to estimate the reference plasma value of this cytokine in children.

One hundred sixty-seven children (97 boys and 70 girls), aged 1.5-18.4 years, were included into the study:

- 104 patients with IBD including 36 with Crohn disease (CD) and 68 with ulcerative colitis (UC),
- 21 patients with chronic hepatitis including 10 with HBV infection, 4 with HCV infection and 7 with autoimmune hepatitis (AIH),
- 42 children in the control group.

TGF- $\beta 1$ level was evaluated in plasma, TGF- $\beta 1$ protein and gene expression were evaluated in tissue (intestinal mucosa in IBD and liver tissue in Ch.h.) by immunohistochemistry (IHC) and reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR), respectively.

Additionally, 4 different polymorphisms of *TGF- $\beta 1$* gene were evaluated – two in exon 1; codon 10 position +869, and codon 25 position +915, and two in promoter region position –800 and –509. The role of these polymorphisms in modification of TGF- $\beta 1$ level in plasma and tissue or clinical course of the diseases were evaluated.

Analyzed groups and subgroups did not differ significantly in age and gender distribution. There were no significant differences in the IBD patients in BMI, however, Cole's index was significantly higher in UC patients in comparison to CD patients. In analyzed clinical signs, blood in stool was significantly more frequent in UC patients. There were no significant differences in TGF- $\beta 1$ level in plasma between study groups. The plasma TGF- $\beta 1$ level did not correlate with age or gender of patients, diagnosis or disease activity, endoscopy or histopathology findings.

In Ch.h. patients there was no correlation between plasma TGF- β 1 level and staging or grading in liver tissue. However, in IBD patients in whom TGF- β 1 level in plasma was evaluated twice (during active stage of the disease and in remission) this cytokine level was significantly higher during disease flare in comparison to remission and to its level in the control group. In IBD patients TGF- β 1 mRNA expression as evaluated by reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR), was significantly higher in tissue samples taken during endoscopy from affected areas in comparison to samples from unaffected areas or the control group. When endoscopy was performed twice (during active disease and in the remission) TGF- β 1 mRNA expression in samples taken during active state, both from affected and unaffected areas, was significantly higher than in respective samples taken during remission. TGF- β 1 mRNA expression in samples taken during remission was not significantly different to the control group.

The tissue TGF- β 1 expression, as evaluated by immunohistochemistry, did not correlate with diagnosis or disease activity, endoscopy and histopathology findings, or TGF- β 1 mRNA expression. In Ch.h. patients there was no correlation between tissue TGF- β 1 expression and staging or grading in liver tissue.

No effect of the analyzed *TGF- β 1* gene polymorphisms on presence of IBD or Ch.h., activity or clinical course of the disease was observed. *TGF- β 1* gene polymorphisms did not influence plasma TGF- β 1 level, tissue protein or gene expression.

Multivariate analysis performed in CD patients revealed significant influence of hematocrit on disease activity analyzed as dependent variable, in UC patients disease activity was significantly affected by iron level, CRP and hematocrit.

The conclusions of the study are as follows:

1. It appears that plasma TGF- β 1 level cannot be used in diagnosis and differentiation of chronic diseases of digestive tract in children.
2. TGF- β 1 level in plasma cannot be used as a marker of clinical or endoscopic and histopathological activity of inflammatory bowel disease. In chronic hepatitis patients plasma TGF- β 1 level is not related to staging or grading in the liver tissue. This finding may be due to low level of fibrosis observed in liver tissue of the studied children.
3. It appears that local expression of TGF- β 1 evaluated by IHC should not be used as a sole marker in differentiating and monitoring the course of IBD and Ch.h. in children.
4. Evaluation of TGF- β 1 mRNA expression by Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction is a valuable method enabling precise localization of disease changes in intestinal mucosa.
5. Repeated measurement of TGF- β 1 level in plasma and evaluation of TGF- β 1 mRNA expression by RT-PCR in bowel mucosa may be used as prognostic factor in course of the disease.
6. In children with Ch.h. evaluation of TGF- β 1 mRNA expression by Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction does not appear to be a valuable method in evaluating pathologic changes in liver tissue.

7. The polymorphisms of *TGF- β 1* gene do not appear to influence the incidence and clinical course of chronic inflammatory diseases of digestive system in children.
8. Due to relatively low number of patients in the analyzed groups it seems advisable to perform similar complex study in larger groups of patients with chronic inflammatory diseases of digestive tract in children.
9. The study allowed to establish reference values for plasma TGF- β 1 concentration in children. It does not appear to be influenced by gender or age of children.

10. Piśmiennictwo

1. Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Demirbag K, Yalniz M. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11(21): 3260-3263.
2. Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease – environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31): 29-43.
3. Ardizzone S, Porro GB. Biologic Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *Drugs* 2005; 65(16): 2253-2286.
4. Arkwright PD, Chase JM, Babbage S, Pravica V, David TJ, Hutchinson IV. Atopic dermatitis is associated with a low-producer transforming growth factor beta (1) cytokine genotype. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(2): 281-284.
5. Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55(6): 459-462.
6. Atabay B, Oren H, Irken G, Kizıldag S, Tunali S, Türker M, Yilmaz S. Role of transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25(11): 885-889.
7. Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 110(4): 975-984.
8. Bal J. *Biologia molekularna w medycynie – elementy genetyki klinicznej*. Wyd. Naukowe PWN, 2001, Warszawa; 73-74.
9. Barnard JA, Coffey RJ, Pelton RW, Moses HL. Distribution of transforming growth factor β (TGFB) mRNA and protein in small intestine. *Gastroenterology* 2005; 98(5): A483.
10. Barnes BH, Borowitz SM, Saulsbury FT, Hellems M, Sutphen JL. Discordant erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in children with inflammatory bowel disease taking azathioprine or 6-mercaptopurine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 509-512.
11. Baumgart TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 82-90.
12. Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(2): 535-543.
13. Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Ferguson MW, Ollier WE. Novel single nucleotide polymorphisms in the 3'-UTR of the TGFbetaRI and TGFbetaRIII genes. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(5): 445-446.
14. Bayer EM, Herr W, Kanzler S, Waldmann C, Meyer Zum Büschenfelde KH, Dienes HP, Lohse AW. Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity. *J Hepatol* 1998; 28(5): 803-811.
15. Bellamy R, Hill AV. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(4): 483-487.

16. Ben-Ari Z, Pappo O, Druzid T, Sulkes J, Klein T, Samra Z, Gadba R, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Mor E. Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Cytokine* 2004; 7(1): 7-14.
17. Beránek M, Kanková K, Benes P, Izakovicová-Hollá L, Znojil V, Hájek D, Vlková E, Vácha J. Polymorphism R25P in the gene encoding transforming growth factor-beta (TGF-beta1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. *Am J Med Genet* 2002; 109(4): 278-283.
18. Bertoletti A, D'Elcios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C infection. *Gastroenterology* 1997; 112: 193-199.
19. Bhogal RK, Stoica CM, McGaha TL, Bona CA. Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. *J Clin Immunol* 2005; 25(6): 592-603.
20. Bing XIA, Crusius JBA, Meuwissen SGM, Pena AS. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects and immunogenetic studies. *World J Gastroenterology* 1998; 4(5): 446-458.
21. Bleich A, Mahler M. Environment as a critical factor for the pathogenesis and outcome of gastrointestinal disease: experimental and human inflammatory bowel disease and helicobacter-induced gastritis. *Pathobiology* 2005; 72(6): 293-307.
22. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358.
23. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33(1): 99-103.
24. Boberg KM. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6(3): 635-647.
25. Brandes ME, Allen JB, Ogawa Y, Wahl SM. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* 1991; 87(3): 1108-1113.
26. Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(Suppl.): 121S-131S.
27. Buchner A, Iwańczak F. Etiopatogeneza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. W: Iwańczak F (red.). *Gastroenterologia dziecięca – wybrane zagadnienia*. Wyd. I Borgis, Warszawa 2003, 166-173.
28. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28(5): 881-887.
29. Cantor MJ, Nickerson P, Bernstein CN. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(5): 1134-1142.
30. Capuano A, Costanzi S, Peluso G, Zannoni G, Vellone VG, Gremese E, Zoli A, Scott C, Beltrami CA, Romano G, Ferraccioli G. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 ratio at baseline can predict early response to cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus nephritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3633-3639.

31. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med* 1991; 324(14): 933-940.
32. Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törtüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(5): 559-565.
33. Cerwenka A, Kovar H, Majdic O, Holter W. Fas-and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-beta 1. *J Immunol* 1996; 156(2): 459-464.
34. Chen RH, Ebner R, Derynck R. Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities. *Science* 1993; 260(5112): 1335-1338.
35. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
36. Chung HL, Hwang JB, Park JJ, Kim SG. Expression of transforming growth factor beta1, transforming growth factor type I and II receptors, and TNF-alpha in the mucosa of the small intestine in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(1): 150-154.
37. Coll E, Cormand B, Campos B, González-Núñez D, Iñigo P, Botey A, Poch E. Association of TGF-beta1 polymorphisms with chronic renal disease. *J Nephrol* 2004; 17(6): 794-799.
38. Collie B, Camilleri M, Bharucha AE, Sandborn WJ, Burton D. Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and effects of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 653-663.
39. Cotton SA, Gbadegesin RA, Williams S, Brenchley PE, Webb NJ. Role of TGF-beta1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Kidney Int* 2002; 61(1): 61-67.
40. Coupes BM, Williams S, Roberts IS, Short CD, Brenchley PE. Plasma transforming growth factor beta(1) and platelet activation: implications for studies in transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(2): 361-367.
41. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 117(3): 645-652.
42. Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Sakitani K, Shibano K, Okajima A, Yamamoto C, Ogata N, Okumura T, Seki T, Kubota Y, Kan M, McKeehan WL, Inoue K. Differential expression of transforming growth factor-beta and its receptors in hepatocytes and non-parenchymal cells of rat liver after CCl4 administration. *J Hepatol* 1998; 28(4): 572-581.
43. Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Furukawa F, Inoue K. Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury. *Gut* 2000; 46(5): 719-724.
44. De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper H, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Uehlinger E. A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 1968; 2(7568): 626-628.
45. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(1): 120-126.
46. Derynck R, Rhee L, Chen EY, Van Tilburg A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3187-3189.

47. Desmet V. Histopathology of acute and chronic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* 1976; 39(9-10): 299-306.
48. Di Biscegli AM. Long-term outcome of interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1995; 22: 65-67.
49. di Mola FF, Friess H, Scheuren A, Di Sebastiano P, Graber H, Egger B, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease. *Ann Surg* 1999; 229(1): 67-75.
50. Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 1993; 105(5): 1323-1332.
51. Domeñech E. Inflammatory bowel Disease: Current Therapeutic Options. *Digestion* 2006; 73(1): 67-76.
52. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353(14): 1443-1453.
53. Dudás J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(5): 725-735.
54. El-Bassiouny AE, Zoheiry MM, Nosseir MM, El-Ahwany EG, Ibrahim RA, El-Bassiouni NE. Expression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta1 in HCV induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *MedGenMed* 2007; 9: 45.
55. Farmaki E, Papachristou F, Winn RM, Karatzas N, Sotiriou J, Roilides E. Transforming growth factor- β 1 in the urine of young children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 180-183.
56. Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 1994; 94(1): 449-453.
57. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115(1): 182-205.
58. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989; 70: 2081-2095.
59. Flisiak R, Al-Kadasi H, Jaroszewicz J, Prokopowicz D, Flisiak I. Effect of lamivudine treatment on plasma levels of transforming growth factor beta1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and metalloproteinase-1 in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10(18): 2661-2665.
60. Flisiak R, Jaroszewicz J, Lapinski TW, Flisiak I, Prokopowicz D. Effect of pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin treatment on plasma transforming growth factor-beta1, metalloproteinase-1, and tissue metalloproteinase inhibitor-1 in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11(43): 6833-6838.
61. Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1 – possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(47): 1369-1372.

62. Flisiak R, Prokopowicz D. Transforming growth factor-beta1 as a surrogate marker of hepatic dysfunction in chronic liver diseases. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(11): 1129-1131.
63. Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* 2000; 12(6): 677-681.
64. Flisiak R, Wiercińska-Drapała A, Tynecka E. Transformujący czynnik wzrostu β w patogenezie chorób wątroby. *Wiad Lek* 2000; 53(9-10): 530-537.
65. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997; 32(2): 275-282.
66. Freudenberg J, Baumann H, Arnold W, Berger J, Büschenfelde KH. HLA in different forms of chronic active hepatitis. A comparison between adult patients and children. *Digestion* 1977; 15(4): 260-270.
67. Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 1986; 12(3): 281-288.
68. Gabriel A, Ziółkowski A. New terminology of chronic hepatitis, including a scoring scale. *Med Sci Monit* 1997; 3: 113-118.
69. Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316(1-2): 83-94.
70. Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Maté J. Role of biological markers in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 117-129.
71. Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin DB. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* 1997; 15(3): 190-197.
72. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon R, Obląkowski P. Cytokiny. W: Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W (red.). *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, 198-248.
73. Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA. Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol* 2001; 166(10): 6413-6422.
74. Goumenos DS, Kalliakmani P, Tsakas S, Sotsiou F, Vlachoianis JG. Urinary Transforming Growth Factor-beta 1 as a marker of response immunosuppressive treatment, in patients with crescentic nephritis. *BMC Nephrol* 2005; 20: 6-16.
75. Grainger DJ, Masedale DE, Metcalfe JC. TGF- β in blood: a complex problem. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000; 11: 133-145.
76. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999; 8(1): 93-97.
77. Grasl-Kraupp B, Rossmannith W, Ruttikay-Nedecky B, Müllauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998; 28(3): 717-726.

78. Gressner AM, Wulbrand U. Variation of immunocytochemical expression of transforming growth factor (TGF)-beta in hepatocytes in culture and liver slice. *Cell Tissue Res* 1997; 287(1): 143-152.
79. Grüngreiff K, Reinhold D, Ansorge S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine* 1999; 11(12): 1076-1080.
80. Gyulai Z, Balog A, Borbényi Z, Mándi Y. Genetic polymorphisms in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2005; 52(3-4): 463-475.
81. Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 49(2): 190-198.
82. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, Morrell NW, Aldred MA, Trembath RC. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation* 2005; 111(4): 435-441.
83. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nagatoshi Y, Sakata N, Kawa K, Okamura J, Hara T. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30(10): 665-671.
84. Heinzmann A, Bauer E, Ganter K, Kurz T, Deichmann KA. Polymorphisms of the TGF-beta1 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16(4): 310-314.
85. Helanterä I, Teppo AM, Koskinen P, Törnroth T, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager I. Increased urinary excretion of transforming growth factor-beta(1) in renal transplant recipients during cytomegalovirus infection. *Transpl Immunol* 2006; 15(3): 217-221.
86. Höhler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Löhr HF, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26(3): 503-507.
87. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Caillat-Zucman S, Beaugier L, Dupas JL, Van Gossum A, Bonäit-Pellie C, Cortot A, Thomas G. Linkage analyses of chromosome 6 loci, including HLA, in familial aggregations of Crohn disease. *G.E.T.A.I.D. Am J Med Genet* 1994; 52(2): 207-213.
88. Hume GE, Fowler EV, Lincoln D, Eri R, Templeton D, Florin TH, Cavanaugh JA, Radford-Smith GL. Angiotensinogen and transforming growth factor beta1: novel genes in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Med Genet* 2006; 43(10): e51.
89. Hutchinson IV. The role of transforming growth factor-beta in transplant rejection. *Transplant Proc* 1999; 31(7A): 9S-13S.
90. Hyamas JS. Nieswoiste zapalenia jelit. *Pediatrics po Dyplomii* 2006; 10(5): 47-58.
91. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents: Recommendations for Diagnosis – The Porto Criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(1): 1-7.
92. Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005; 40(10): 925-931.
93. International Working Party. Terminology of chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 181-189.

94. Iwańczak F, Krzesiak E, Cader J, Iwańczak B, Stawarski A. Odrębności kliniczne wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. *Gastroenterol Pol* 1997; 4: 379-384.
95. Iwańczak F, Krzesiak E, Iwańczak B. Epidemiologia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohna u dzieci z województwa dolnośląskiego i opolskiego. *Pediatr Pol* 2002; 77: 301-310.
96. Iwańczak F. Obraz kliniczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. W: Iwańczak F (red.). *Gastroenterologia dziecięca – wybrane zagadnienia*. Wyd. I. Borgis, Warszawa 2003, 174-179.
97. James SP. Autoimmune Hepatobiliary Diseases in Samter's Immunologic Diseases. In: Austen KF, Frank MM, Atkinson JP, Cantor H (eds.). Vol.2, 2001; Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 681-693.
98. Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006; 12(6): 961-965.
99. Ju W, Ogawa A, Heyer J, Nierhof D, Yu L, Kucherlapati R, Shafritz DA, Böttinger EP. Deletion of Smad2 in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(2): 654-667.
100. Jung MC, Hartmann B, Diepolder H, Zachoval R, Santantonio T, Gerlach T, Hoffman R, Wachtler M, Eichenlaub D, Paumgartner G, Rielmuller G, Pape GR. Hepatitis B virus elimination supported by CD4+ T lymphocytes with Th1 lymphokine profile. *Hepatology* 1996; 24: 279A.
101. Jung SA, Chung YH, Park NH, Lee SS, Kim JA, Yang SH, Song IH, Lee YS, Suh DJ, Moon IH. Experimental model of hepatic fibrosis following repeated periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(9): 969-975.
102. Junker U, Haufe CC, Nuske K, Rebstock K, Steiner T, Wunderlich H, Junker K, Reinhold D. Elevated plasma TGF-beta1 in renal diseases: cause or consequence? *Cytokine* 2000; 12(7): 1084-1091.
103. Juszczyk J, Gładysz A. Viral hepatitis in Poland. *Hepatol Pol* 1997; 4: 65-70.
104. Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF, Patel DD. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(2): 414-423.
105. Kakumu S, Ito Y, Takayanagi M, Yoshioka K, Wakita T, Ishikawa T, Higashi Y, Yang ZQ. Effect of recombinant human transforming growth factor beta 1 on immune responses in patients with chronic hepatitis B. *Liver* 1993; 13(2): 62-68.
106. Kamar N, Boulestin A, Selves J, Esposito L, Sandres-Saune K, Stébenet M, Chatelut E, Durand D, Rostaing L, Izopet J. Factors accelerating liver fibrosis progression in renal transplant patients receiving ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2005; 76(1): 61-68.
107. Kanamaru Y, Nakao A, Mamura M, Suzuki Y, Shirato I, Okumura K, Tomino Y, Ra C. Blockade of TGF-beta signaling in T cells prevents the development of experimental glomerulonephritis. *J Immunol* 2001; 166(4): 2818-2823.
108. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuca E, Majami T, Kagiyama M, Kikuchi K. VEGF, Basic-FGF and TGF-β in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 822-828.

109. Kanto T, Takehara T, Katayama K, Ito A, Mochizuki K, Kuzushita N, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N, Hori M. Neutralization of transforming growth factor beta 1 augments hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte induction *in vitro*. *J Clin Immunol* 1997; 17(6): 462-471.
110. Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G, Dienes HP, Lohse AW. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepatol* 2001; 8(6): 430-437.
111. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; 137(12): 3855-3860.
112. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 402-408.
113. Kim SJ, Im ZH, Markowiz SD, Bang YJ. Molecular mechanisms of activation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 2000; 11: 159-168.
114. Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35(3): 196-202.
115. Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata SJ. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *Infect Dis* 2006; 193(10): 1371-1374.
116. Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(12): 1294-1300.
117. Kirmaz C, Terzioglu E, Topalak O, Bayrak P, Yilmaz O, Ersoz G, Sebik F. Serum transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15(2): 112-116.
118. Kmiec Z, Kartanowicz D, Wierzbicki P. Rola odpowiedzi immunologicznej w patogenezie chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr Wsp Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004; 6: 417-422.
119. Kobayashi H, Hayashi N, Hayashi K, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Connective tissue growth factor and progressive fibrosis in biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2005; 21(1): 12-16.
120. Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A, Lane GJ, Furuhashi A, Sueyoshi N, Miyano T. Are stable postoperative biliary atresia patients really stable? *Pediatr Surg Int* 2001; 17(2-3): 104-107.
121. Kobayashi K, Atoh M, Konoeda Y, Yagita A, Inoko H, Sekiguchi S. HLA-DR, DQ and T cell antigen receptor constant beta genes in Japanese patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1990; 80(3): 400-403.
122. Kojima S, Nara K, Rifkin DB. Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor- β in bovine endothelial cells. *J Cell Biology* 1993; 121: 439-448.
123. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(2): 353-358.

124. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
125. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(7): 2918-2921.
126. Kusugami K, Ina K, Ando T, Hibi K, Nishio Y, Goto H. Immunomodulatory therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2004; 39(12): 1129-1137.
127. Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, Brenner DA, Fried MW. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 35(6): 749-755.
128. Lamireau T, Le Bail B, Boussarie L, Fabre M, Vergnes P, Bernard O, Gautier F, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGFbeta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy. *J Hepatol* 1999; 31(2): 248-255.
129. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis. *Bone* 2003; 32(3): 297-310.
130. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997; 20(3): 289-294.
131. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1340.
132. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(1): 16-26.
133. Le Marchand L, Haiman CA, van den Berg D, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. T29C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and postmenopausal breast cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(3): 412-415.
134. Lebensztejn DM, Skiba E, Kaczmarek M, Werpachowska I, Sobaniec-Lotowska M. Ocena stężenia transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$, interleukiny 12 i interleukiny 5 w surowicy dzieci chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu B. *Pol Merkur Lek* 2003; 15(85): 86-88.
135. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska M, Kaczmarek M, Werpachowska I, Sienkiewicz J. Serum concentration of transforming growth factor (TGF)-beta 1 does not predict advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepato-gastroenterology* 2004; 51(55): 229-233.
136. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006; 12(21): 3338-3343.
137. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Abdallah A, Lympany P, Song YW. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms in Korean patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 2004; 63(5): 491-495.
138. Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745.

139. Lee-Chen GJ, Liu KP, Lai YC, Juang HS, Huang SY, Lin CY. Significance of the tissue kallikrein promoter and transforming growth factor-beta1 polymorphisms with renal progression in children with vesicoureteral reflux. *Kidney Int* 2004; 65(4): 1467-1472.
140. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.
141. Lionetti P, Pazzaglia A, Moriondo M, Azzari C, Resti M, Amorosi A, Vierucci A. Differing patterns of transforming growth factor-beta expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29(3): 308-313.
142. Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2): 92-94.
143. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995; 49(2): 57-68.
144. Liu YG, Lu JH, Wang XX, Yang JL, Lang ZW, Meng X, Zhang LJ, Sun L, Zhang SJ, Li JQ, Song CZ. Influence of HGBcAg in liver cell plasma on expression of transforming growth factor-beta 1 in liver tissue of low-grade chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12(1): 127-129.
145. Lohse AW, Kögel M, Meyer zum Büschenfelde KH. Evidence for spontaneous immunosuppression in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1995; 22(2): 381-388.
146. Lücke CD, Philpott A, Metcalfe JC, Thompson AM, Hughes-Davies L, Kemp PR, Heskett R. Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61(2): 482-485.
147. Lüethviksson BR, Gunnlaugsdóttir B. Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 2003; 58(2): 129-138.
148. Lutfalla G, Uze G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol* 2006; 410: 386-400.
149. Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* 1994; 153(5): 1936-1946.
150. Madretsma S, Wolters LM, van Dijk JP, Tak CJ, Feyerabend C, Wilson JH, Zijlstra FJ. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8(10): 1017-1020.
151. Maggiore G, Sciveres M. Autoimmune Hepatitis: a Childhood Disease. *Curr Ped Rev* 2005; 1: 73-90.
152. Mak JC, Leung HC, Ho SP, Law BK, Ho AS, Lam WK, Ip MS, Chan-Yeung MM. Analysis of TGF-beta(1) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(1): 92-96.
153. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinini MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor interleukin 12 (IL-12) induces T helper 1 (Th1) – specific immune response and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1199-1204.
154. Manns M. Current state of Interferon Therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Liver Disease* 2002; 22: 7-13.
155. Marek A, Zagierski M, Liberek A, Aleksandrowicz E, Korzon M, Krzykowski G, Szlagatys-Sidorkiewicz A. TGF-beta, IL-10, IL-4 in colostrum of allergic and non-allergic mothers. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2008, 18 (2) praca przyjęta do druku.

156. Marek B, Kajdaniuk D, Janczewska-Kazek E, Beniowski M, Swietochowska E, Kos-Kudła B, Ostrowska Z, Mazurek U, Wilczok T, Nowak M, Siemińska L, Borgiel-Marek H, Strzyzewski A, Januła A, Sierek K, Niedzielski Z. Stężenia aminoterminalnego propeptydu prokolagenu typu III (PIIINP) oraz transformującego czynnika wzrostu- β 1 (TGF- β 1) we krwi obwodowej chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B i C. *Pol Arch Med Wewn* 2003; 109(6): 603-608.
157. Marek B, Kajdaniuk D, Mazurek U, Janczewska-Kazek E, Strzałka B, Beniowski M, Kos-Kudła B, Kajdaniuk J, Niedziółka D, Ostrowska Z, Borgiel-Marek H, Siemińska L, Nowak M, Pakuła D, Gatnar A, Gnot R, Filipczyk P. Ocena ilościowa mRNA TGF- β 1 w biopsji wątroby w powiązaniu ze średniodobowym stężeniem TGF- β 1 w surowicy u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. *Pol Arch Med Wewn* 2005; 114(2): 738-745.
158. Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, Nakase H, Tamaki H, Uchida K, Nishi T, Asada M, Kawasaki K, Fukui T, Yoshizawa H, Ohashi S, Inoue S, Kawanami C, Hiai H, Tabata Y, Chiba T. Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. *Gastroenterology* 2005; 128(4): 975-986.
159. Matsuura T, West GA, Youngman KR, Klein JS, Focchi C. Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104(2): 448-458.
160. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K, Seki T. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46(1): 48-57.
161. Matusiewicz K. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby. W: Iwańczak F (red.). *Gastroenterologia dziecięca – wybrane zagadnienia*. Wyd. I, Borgis, Warszawa 2003, 250-261.
162. Mazur G, Bogunia-Kubik K, Wrobel T, Kuliczowski K, Lange A. TGF-beta1 gene polymorphisms influence the course of the disease in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Cytokine* 2006; 33(3): 145-149.
163. Mazur W, Braczkowski R, Gonciarz M, Petelentz M, Mazurek U, Wilczok T, Gonciarz Z. Fibrosis TGF- β 1 marker in blood of chronic hepatitis C patients during interferon alfa-2B therapy. *Med Sci Monit* 1999; 5(Suppl. 1): 73-76.
164. Mazur W, Gonciarz M, Gonciarz Z. Włóknienie wątroby – aspekty kliniczne. *Med Dopl* 2003; 10: 30-38.
165. McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF- β isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-182.
166. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003; 162(4): 1355-1360.
167. Melani L, Hirsch E, Guanzone M, Pizarro TT, Hiesch D, Cominelli F. Deletion of the IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) gene increases susceptibility to experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 1997; 112: 1040A.
168. Michel K, Roth S, Trautwein C, Gong W, Flemming P, Gressner AM. Analysis of the expression pattern of the latent transforming growth factor beta binding protein isoforms in normal and diseased human liver reveals a new splice variant missing the proteinase-sensitive hinge region. *Hepatology* 1998; 27(6): 1592-1599.
169. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children. *Clin Liver Dis* 2002; 6(3): 623-34.

170. Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsu-moto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsunami H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene poly-morphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection – association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42(4): 505-510.
171. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Re-spir Cell Mol Biol* 1997; 17(3): 326-333.
172. Miskovitz P, Rochwarger A. The evaluation and treatment of the patient with diarrhea. In: Miskovitz P, Rochwarger A (eds.). *Infectious causes of diarrhea*. Andover Medical Publishers, Boston 1993, 45-96.
173. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001; 108(4): 601-609.
174. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ. Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 116: 776-803.
175. Moradpour D, Wands JR. Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1993; 332: 1092-1093.
176. Moss MT, Sanderson JD, Tizard ML, Hermon-Taylor J, el-Zaatari FA, Markesich DC, Gra-ham DY. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tis-sues. *Gut* 1992; 33(9): 1209-1213.
177. Mullerowa I, Rigppoulou E, Haigh P. Quantitative and qualitative changes in HCV-specific liver infiltrating T-cells parallel the progression of liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 32: 430A.
178. Munger JS, Hampel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanism activation. *Kidney Int* 1997; 57: 1376-1382.
179. Murakami S, Takashima H, Sato-Watanabe M, Chonan S, Yamamoto K, Saitoh M, Saito S, Yoshimura H, Sugawara K, Yang J, Gao N, Zhang X. Ursolic acid, an antagonist for transfor-ming growth factor (TGF)-beta1. *FEBS Lett* 2004; 566(1-3): 55-59.
180. Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology* 2005; 331(2): 407-417.
181. Muratori P, Czaja AJ, Muratori L, Pappas G, Maccariello S, Cassani F, Granito A, Ferrari R, Mantovani V, Lenzi M, Bianchi FB. Genetic distinctions between autoimmune hepatitis in Italy and North America. *World J Gastroenterol* 2005; 11(12): 1862-1866.
182. Murawaki Y, Nishimura Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13(7): 680-684.
183. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mecha-nisms and physiology. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 2000; 11: 59-69.
184. Nakao A, Miike S, Hatano M, Okumura K, Tokuhisa T, Ra C, Iwamoto I. Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 en-hances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med* 2000; 192(2): 151-155.

185. Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1997; 4(1): 29-35.
186. Nguyen Van N, Taglinger K, Helps CR, Tasker S, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using quantitative real-time RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 15: 113(3-4): 404-414.
187. Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB. Latent transforming growth factor- β binding protein domains involved in activation and transglutaminase – dependent cross-linking of latent transforming growth factor- β . *J Cell Biology* 1997; 136: 1151-1163.
188. O'Connor HJ. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 201(Suppl.): 11-15.
189. Okamoto Y, Gotoh Y, Uemura O, Tanaka S, Ando T, Nishida M. Age-dependent decrease in serum transforming growth factor (TGF)-beta 1 in healthy Japanese individuals; population study of serum TGF-beta 1 level in Japanese. *Dis Markers* 2005; 21(2): 71-74.
190. Okamura J, Hara T. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30(10): 665-671.
191. Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990; 86(2): 453-462.
192. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(10): 1075-1081.
193. Oshikawa O, Matsuzawa Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 1999; 30(1): 1-7.
194. Osterreicher CH, Datz C, Stickel F, Hellerbrand C, Penz M, Hofer H, Wrba F, Penner E, Schuppan D, Ferenci P. TGF-beta1 codon 25 gene polymorphism is associated with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Cytokine* 2005; 1(2): 142-148.
195. Park BL, Han IK, Lee HS, Kim LH, Kim SJ, Shin HD. Identification of novel variants in transforming growth factor-beta 1 (TGFB1) gene and association analysis with bone mineral density. *Hum Mutat* 2003; 22(3): 257-258.
196. Patel A, Scott WR, Lympany PA, Rippin JD, Gill GV, Barnett AH, Bain SC. Warren 3/UK GoKind Study Group. The TGF-beta 1 gene codon 10 polymorphism contributes to the genetic predisposition to nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22(1): 69-73.
197. Pawłowska M, Szaflarska-Szczepanik A, Doroszewski G, Czerwionka-Szaflarska M. Incidence and risk factor of HBV infections in children: our own investigations. *Med Sci Monit* 1996; 2: 466-468.
198. Peña AS, Crusius JB. Food allergy, coeliac disease and chronic inflammatory bowel disease in man. *Vet Q* 1998; 20 (Suppl. 3): S49-S52.
199. Penttila IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res* 1998; 44(4): 524-531.
200. Peters IR, Helps CR, Calvert EL, Hall EJ, Day MJ. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103(1-2): 101-111.

201. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155(1): 128-133.
202. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999; 13: 2105-2124.
203. Pinzani M, Marra F. Cytokines receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Sem Liver Dis* 2002; 21: 397-416.
204. Potter BJ, Elias E, Thomas HC, Sherlock S. Complement metabolism in chronic liver disease: catabolism of C1q in chronic active liver disease and primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1980; 78 (5 Pt 1): 1043-1040.
205. Powell LW, Subramaniam VN, Yapp TR. Haemochromatosis in the new millennium. *J Hepatol* 2000; 32(Suppl. 1): 48-62.
206. Proulx F, Litalien C, Turgeon JP, Mariscalco MM, Seidman E. Circulating levels of transforming growth factor-beta1 and lymphokines among children with hemolytic uremic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(1): 29-34.
207. Quarmby S, Fakhoury H, Levine E, Barber J, Wylie J, Hajeer AH, West C, Stewart A, Magee B, Kumar S. Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol.* 2003; 79(2): 137-143.
208. Roglar G, Andus T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389.
209. Rosendahl A, Checchin D, Fehniger TE, ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(1): 60-68.
210. Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, Schwarz KB. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res* 1998; 44(3): 402-409.
211. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Björntorp P. Increased abdominal obesity, insulin and glucose levels in nondiabetic subjects with a T29C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene. *Horm Res* 2003; 59(4): 191-194.
212. Roulot D, Durand H, Coste T, Rautureau J, Strosberg AD, Benarous R, Marullo S. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: absence of correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology* 1995; 21(2): 298-304.
213. Rufo PA, Bousvaros A. Current Therapy of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Pediatr. Drugs* 2006; 8(5): 279-302.
214. Ryzko J, Socha J, Zujko P. Ocena stanu odżywienia u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Pediatr Pol* 1991; 1-2: 112-119.
215. Ryzko J, Woynarowski M. Ocena przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci według systemu punktowego. *Pediatr Pol* 1995; 70: 569-573.
216. Ryzko J, Woynarowski M. Zastosowanie skali punktowej w ocenie aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. *Pediatr Pol* 1995; 70: 585-589.

217. Sacco R, Leuci D, Tortorella C, Fiore G, Marinosci F, Schiraldi O, Antonaci S. Transforming growth factor beta1 and soluble Fas serum levels in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 2000; 12(6): 811-814.
218. Sack U, Burkhardt U, Borte M, Schädlich H, Berg K, Emmrich F. Age-dependent levels of select immunological mediators in sera of healthy children. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(1): 28-32.
219. Saito S, Yoshida M, Ichijo M, Ishizaka S, Tsujii T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin Exp Immunol* 1993; 94(1): 220-224.
220. Sakaguchi K, Kitano M, Nishimura M, Senoh T, Ohta T, Terao M, Shinji N, Koide N, Tsuji T. Serum level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and the expression of TGF-beta receptor type II in peripheral blood mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51(60): 1780-1783.
221. Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (USA), 2001.
222. Sato F, Narita I, Goto S, Kondo D, Saito N, Ajiro J, Saga D, Ogawa A, Kadomura M, Akiyama F, Kaneko Y, Ueno M, Sakatsume M, Gejyo F. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism modifies the histological and clinical manifestations in Japanese patients with IgA nephropathy. *Tissue Antigens* 2004; 64: 35-42.
223. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994; 35(5): 696-700.
224. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996, 4; 347(9010):1212-1217.
225. Schneiber B, Dyduch A. Stężenie transformującego czynnika wzrostuβ1 w surowicy krwi dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i jego zachowanie się w czasie leczenia lamiwudyną. *Pediatrics Wsp Gastroenterol Hepatol i Żywnienie Dziecka* 2004; 6(3): 311-315.
226. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of IL-10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1434-1444.
227. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002; 359: 62-69.
228. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, Kiso S, Matsuzawa Y. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 1994; 73(9): 2275-2279.
229. Smelie J, Prescod N, Shaw PJ, Ridson RA, Bryant TN. Childhood reflux and urinary infection: a follow-up of 10-41 years in 226 adults. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 727-736.
230. Smółko M, Zoch-Zwierz W, Wasilewska A, Al-Din KJ. Ocena stężenia TGF-β1 w moczu dzieci z odpływami pęcherzowo-moczowodowymi. *Pediatr Pol* 2004; 79(2): 115-119.
231. Solari V, Owen D, Puri P. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism with reflux nephropathy. *J Urol* 2005; 174: 1609-1611.
232. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 707-712.
233. Sparks R, Bigler J, Sibert JG, Potter JD, Yasui Y, Ulrich CM. TGF-beta1 polymorphism (L10P) and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. *Int J Epidemiol* 2004; 33(5): 955-961.

234. Spee B, Arends B, van den Ingh TS, Brinkhof B, Nederbragt H, Ijzer J, Roskams T, Penning LC, Rothuizen J. Transforming growth factor beta-1 signalling in canine hepatic diseases: new models for human fibrotic liver pathologies. *Liver Int* 2006; 26(6): 716-725.
235. Srivastava M, Zurakowski D, Cheifetz P, Leichtner A, Bousvaros A. Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(5): 548-553.
236. Stawarski A, Iwańczak F. Obraz kliniczny choroby Leśniowskiego-Crohna. W: Iwańczak F (red.). *Gastroenterologia dziecięca – wybrane zagadnienia*. Wyd. I, Borgis, Warszawa 2003, 185-194.
237. Stenson WF, Newberry RD, Lorenz RG. Immunological Disease of the Gastrointestinal Tract. In: Austen KF, Frank MM, Atkinson JP, Cantor H (eds.). *Samter's Immunologic Diseases*. Vol. 2. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 699-704.
238. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45(3): 395-401.
239. Sturm A, Schulte C, Schatton R, Becker A, Cario E, Goebell H, Dignass AU. Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(4): 445-450.
240. Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, Tsuji K, Inoko H. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1993; 36(2): 112-118.
241. Sugiura Y, Niimi T, Sato S, Yoshinouchi T, Banno S, Naniwa T, Maeda H, Shimizu S, Ueda R. Transforming growth factor beta1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 826-828.
242. Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Hasegawa I, Sakurai M, Fujiwara K, Ohno T, Ueda R, Mizokami M. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(10): 1139-1143.
243. Swift GL, Srivastava ED, Stone R, Pullan RD, Newcombe RG, Rhodes J, Wilkinson S, Rhodes P, Roberts G, Lawrie BW. Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's Disease. *Gut* 1994; 35(3): 363-368.
244. Sýkora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, Varvarovská J, Pazdiora P, Pozler O, Stozický F. Cytokine tumor necrosis factor-alpha promoter gene polymorphism at position -308 G->A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42(5): 479-487.
245. Sylvan SP. Cellular immune response to hepatitis B virus antigens in man. *Liver* 1991; 11: 1-23.
246. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC, Kemp PR, Grainger DJ, Kaski JC, Crossman DC, Francis SE, Gunn J, Jeffery S, Heathcote K. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci* 1998; 95(6): 659-667.
247. Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Analysis of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine* 2003; 24(5): 173-181.
248. Takeuchi M, Alard P, Streilein JW. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol* 1998; 160(4): 1589-1597.

249. Tanaka M, Riddell R, Saito H, Soma Y, Hidaka H, Kudo H. Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(1): 55-67.
250. Tang B, Böttlinger EP, Jakowlew SB, Bagnall KM, Mariano J, Anver MR, Letterio JJ, Wakefield LM. Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med* 1998; 4(7): 802-807.
251. Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999; 179(4): 1004-1006.
252. Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. *Hepatology* 2000; 31(4): 819-827.
253. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 23; 348(9039):1417-1419.
254. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332(16): 1065-1069.
255. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol* 1995; 23(3): 307-317.
256. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104(3): 741-748.
257. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Chang WY, Tsai JH. Urinary transforming growth factor beta1 levels in hepatitis C virus-related chronic liver disease: correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology* 1997; 25(5): 1141-1146.
258. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Yang ML, Ho MS, Chang WY, Hsieh MY, Lin ZY, Tsai JH. Elevated urinary transforming growth factor-beta1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 76(2): 244-250.
259. Tseng CT, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001; 33(5): 1312-1320.
260. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Doi Y, Yamada A, Oshikawa O, Matsuzawa Y. Reduced plasma transforming factor- β 1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon- α therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 1999; 30: 1-7.
261. Van Heel DA, McGovern DP, Jewell DP. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet* 2001; 357(9272): 1902-1904.
262. Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002; 36(2): 271-277.
263. Wahl SM. Transforming Growth Factor β : The Good, the Bad and the Ugly. *J Exp Med* 1994; 180: 1587-1590.

264. Wakefield LM, Letterio JJ, Chen T, Danielpour D, Allison RS, Pai LH, Denicoff AM, Noone MH, Cowan KH, O'Shaughnessy JA, Sporn MB. Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1(1): 129-136.
265. Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003; 9(4): 641-644.
266. Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11(13): 1929-1936.
267. Wasilewska AM, Zoch-Zwierz WM. Transforming growth factor-beta1 in nephrotic syndrome treated with cyclosporine and ACE inhibitors. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(12): 1349-1353.
268. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci* 1992; 1(25): 1953-1956.
269. Wen L, Ma Y, Bogdanos DP, Wong FS, Demaine A, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pediatric autoimmune liver diseases: the molecular basis of humoral and cellular immunity. *Curr Mol Med* 2001; 1(3): 379-389.
270. Wiercińska-Drapała A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(4): 605-608.
271. Wiercińska-Drapała A, Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of ulcerative colitis activity on plasma concentration of transforming growth factor beta-1. *Cytokine* 2001; 14(6): 343-346.
272. Witowski J, Knapowski J. Transforming growth factor-beta: a new approach to the pathogenesis of glomerulonephritis and glomerulosclerosis. *Przegl Lek* 1995; 52(9): 467-473.
273. Woolley N, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J. Cytokine gene polymorphisms and genetic association with coeliac disease in the Finnish population. *Scand J Immunol* 2005; 61(1): 51-56.
274. Wu F, Yao H, Bader A, Dong F, Zhu F, Wu N, Wang B, Li H, Brockmeyer NH, Altmeyer P. Decorin gene transfer inhibited the expression of TGFbeta1 and ECM in rat mesangial cells. *Eur J Med Res* 2007; 12(8): 360-368.
275. Xian CJ, Xu X, Mardell CE, Howarth GS, Byard RW, Moore DJ, Miettinen P, Read LC. Site-specific changes in transforming growth factor-alpha and -beta1 expression in colonic mucosa of adolescents with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(6): 591-600.
276. Yamada T, Volkmer C, Crisham B. Antioxidant properties of 5-ASA: potential mechanism for its anti-inflammatory activity. *Can J Gastroenterol* 1990; 4: 295-302.
277. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 166(12): 7282-7289.
278. Yang SP, Woolf AS, Yuan HT, Scott RJ, Risdon RA, O'Hare MJ, Winyard PJ. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. *Am J Pathol* 2000; 157(5): 1633-1647.
279. Yang YH, Lai HJ, Kao CK, Lin YT, Chiang BL. The association between transforming growth factor-beta gene promoter C-509T polymorphism and Chinese children with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(9): 972-975.

-
280. Yao ZQ, Hiotellis AL, Nguyen DT, Hahn YS. HCV core protein inhibits the function of human T lymphocytes by interfering with the mapk-dependent down-stream signaling events. *Hepatology* 2001; 34: 431A.
 281. Young DG, Skibinski G, Mason JI, James K. The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) levels in normal healthy blood donors. *Clin Exp Immunol* 1999; 117(3): 476-481.
 282. Zein NN, Germer JJ, El-Zayadi AR, Vidigal PG. Ethnic differences in polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(4): 434-437.
 283. Zilberman L, Maharshak N, Arbel Y, Rogowski O, Rozenblat M, Shapira I, Berliner S, Arber N, Dotan I. Correlated expression of high-sensitivity C-reactive protein in relation to disease activity in inflammatory bowel disease: lack of differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion* 2006; 73(4): 205-209.
 284. Ziv E, Cauley J, Morin PA, Saiz R, Browner WS. Association between the T29-->C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: The Study of Osteoporotic Fractures. *JAMA* 2001; 285(22): 2859-2863.