

AGNIESZKA DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA¹, MARTA KACZMAREK², JUSTYNA HOPPE-GOŁĘBIEWSKA³,
ROBERT KALAK⁴, RYSZARD SŁOMSKI^{2,3,4}, KRZYSZTOF LINKE¹

WPLYW WARIANTU MUTACJI *NOD2/CARD15* NA WYSTĘPOWANIE OBJAWÓW SPOZA PRZEWODU POKARMOWEGO U CHORYCH Z CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA W POPULACJI POLSKIEJ

THE INFLUENCE OF THE NOD2/CARD15 GENE MUTATION VARIANT ON THE INCIDENCE OF EXTRAINTestinal SYMPTOMS IN PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE IN A POLISH POPULATION

¹Katedra i Klinika Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: prof. Krzysztof Linke

²Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Kierownik: prof. Ryszard Słomski

³Laboratorium Genetyki Molekularnej PAN w Poznaniu

Kierownik: prof. Ryszard Słomski

⁴Wydział Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

Kierownik: prof. Ryszard Słomski

Streszczenie

Wstęp. Przewlekłe NZChJ można podzielić na dwie główne grupy: przewlekłe nieswoiste wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC). Choroba Leśniowskiego-Crohna jest pełnościennym, przeważnie ziarniniakowym zapaleniem, które może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż do odbytu. Aktualnie zapadalność w krajach Unii Europejskiej wynosi 5 nowych przypadków na 100 000 ludności rocznie. W Polsce sytuacja epidemiologiczna nie jest dokładnie znana. ChLC mogą towarzyszyć objawy spoza przewodu pokarmowego. Objawy te mogą mieć charakter ogólnoustrojowy lub dotyczyć określonych układów.

Celem pracy było ustalenie czy w badanej populacji polskiej 150 osób z potwierdzoną chorobą Leśniowskiego-Crohna, występowanie objawów spoza przewodu pokarmowego ma związek z obecnością wariantu mutacji *NOD2/CARD15*.

Materiał i metody. Materiałem do analizy mutacji i polimorfizmu genów odpowiedzialnych za wywoływanie ChLC, w tym także *NOD2/CARD15* u człowieka był DNA izolowany z leukocytów krwi obwodowej. Badaniem objęto pacjentów z potwierdzoną histopatologicznie, radiologicznie lub w materiale operacyjnym chorobą.

Wyniki. W badanej populacji polskiej pacjentów z ChLC najczęściej obserwowanym wariantem mutacji *NOD2/CARD15* jest zmiana w pozycji 802C > T (Pro268Ser) – dotyczy to 49,5% badanych chorych. W badanej populacji wykazano współwystępowanie mutacji 802C > T (Pro268Ser) i 1007fsins (3020insC), przy czym u każdego chorego z obecną mutacją ramkową 1007fsins (3020insC) wykazano równoległe występowanie mutacji 802C > T (Pro268Ser). U chorych będących homozygotami dla opisywanej cechy 802C > T (268Ser) stwierdzono znamienne statystycznie występowanie młodszego wieku, w którym ujawniły się pierwsze objawy choroby oraz znamienne częściej występujących objawów spoza przewodu pokarmowego: zapalenie stawów, zapalenie tęczówki, zmian skórnych (rumień guzowaty).

Wnioski. Obecność wariantu mutacji 802C > T w obu allelach warunkuje wystąpienie pierwszych objawów choroby we wcześniejszym wieku oraz zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zmian stawowych, zapalenia tęczówki oraz rumienia guzowatego u chorych z ChLC w badanej populacji. Drugim, co do częstości występowania wariantem mutacji genu *NOD2/CARD15* w badanej populacji jest 1007_{fs}ins. Obecność wariantu mutacji 1007_{fs}ins zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia tęczówki i rumienia guzowatego u chorych z ChLC w badanej populacji. Obecność wariantu mutacji 1007_{fs}ins współistnieje z wariantem 802C > T u wszystkich chorych z ChLC w badanej populacji.

SŁOWA KLUCZOWE: choroba Leśniowskiego-Crohna, objawy spoza przewodu pokarmowego, gen *NOD2/CARD15*.

Summary

Introduction. Inflammatory bowel diseases (IBD) belong to those chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract whose etiology is still unknown. IBD are divided into ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) which have many features in common. Morbidity between these diseases differs only slightly but the frequency of CD is increasing, especially in a form involving the colon. The first symptoms and the diagnosis of both diseases usually occur between 15 and 35 years of age but the symptoms can appear at any age. It is postulated that in the etiology of the disease genetic, environmental and immunological factors are involved. A family history is strong proof of a genetic connection. Recently some genes relating to a predisposition to the IBD were localized within chromosomes 3, 7, 12 and 16, but the most significant locus for CD turned out to be the pericentromeric region of chromosome 16, known as IBD1. A mutation found in the *NOD2* gene located in this region seems to be correlated to CD. The *NOD2* protein is a cytosolic receptor sensitive to pathological bacterial microflora. *NOD2* is expressed in monocytes and activates the nuclear factor (NF-κB) – a crucial transcription factor participating in the initiation of the immunological response in inflammatory process.

The aim of the study was to estimate the influence of mutations in the *NOD2/CARD15* gene in patients with Crohn's disease with the presence of extraintestinal symptoms.

Material and methods. Molecular analysis concerned 4 exons (4, 8, 9, 11) of the *NOD2/CARD15* gene, where these mutations were observed in Caucasians. A group of 150 Polish patients affected with CD was examined.

Results. The commonest *NOD2/CARD15* mutation found in this sample Polish population is 802C > T (P268S). The second commonest variant, coexisting with the previous one, is frameshift mutation 1007fsins.

In homozygotic patients a younger age of onset of disease and the presence of extraintestinal symptoms, such as arthritis, iritis and erythema nodosum were found.

Conclusions.

- The most frequently encountered variant of the *NOD2/CARD15* mutation in the examined population was 802C > T and the second most often variant was 1007_{fs}ins.
- The presence of the 802C > T mutation in both alleles (homozygote) influences on the younger age of onset of CD and increases the probability of arthritis, uveitis and erythema nodosum in these patients.
- The presence of the 1007_{fs}ins mutation in the analysed population also increases the probability of uveitis and erythema nodosum incidence in CD patients.
- The 1007_{fs}ins mutation in the population analysed coexists with the 802C > T mutation.

KEY WORDS: Crohn's disease, extraintestinal symptoms, *NOD2/CARD15* gene mutation.

Wstęp

Nieswoiste zapalne choroby jelit (NZChJ) to ogólny termin określający grupę przewlekłych schorzeń zapalnych o nieznannej etiologii zajmujących przewód pokarmowy. Ponieważ nie mają one żadnych cech patognomicznych, ani też nie istnieją specyficzne testy diagnostyczne, ich rozpoznanie ustala się przez wykluczenie. Jednak obraz kliniczny bywa na tyle charakterystyczny, że w większości przypadków pozwala na postawienie trafnego rozpoznania. Przewlekłe NZChJ można podzielić na dwie główne grupy: przewlekłe nieswoiste wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC).

Choroba Leśniowskiego-Crohna jest pełnościennym, przeważnie ziarniniakowym zapaleniem, które może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż do odbytu. Pojedyncze przypadki odpowiadające tej chorobie były opisywane już w XVIII i XIX wieku. Autorem pierwszego polskiego opisu był warszawski chirurg – Antoni Leśniowski, który w 1904 roku przedstawił przypadek zapalnego guza jelita krętego z przetoką do wstępnicy. W 1932 roku Crohn, Ginzburg i Oppenheimer ze Szpitala Mount Sinai w Nowym Jorku wyodrębnili i opisali jako nową jednostkę kliniczną i patologiczną zapalenie końcowego odcinka jelita krętego (*ileitis terminalis*). Od tego czasu nazwę choroby łączy się z nazwiskiem Crohna bez względu na lokalizację zmian jelitowych.

Podobnie jak WZJG, tak i ChLC występuje przede wszystkim w wysoko rozwiniętych krajach Europy Zachodniej i Ameryki Północnej. W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych obserwowano wyraźny wzrost zapadalności, który dotyczył głównie ChLC jelita grubego. Aktualnie zapadalność w krajach Unii Europejskiej wynosi 5 nowych przypadków na 100 000 ludności rocznie. W Polsce sytuacja epidemiologiczna nie jest dokładnie znana, ale wydaje się, że ChLC występuje rzadziej niż WZJG.

Najczęstszym miejscem dotkniętym chorobą jest końcowy odcinek jelita krętego (40–50% wszystkich przypadków). Jelito cienkie i grube są zajęte jednocześnie w 30–40% przypadków, a samo jelito grube w 20%. Znacznie rzadziej choroba umiejscawia się w proksymalnym odcinku

jelita cienkiego i wyjątkowo w górnym odcinku przewodu pokarmowego i wyrostku robaczkowym.

Najbardziej charakterystyczną cechą choroby są odcinkowe zmiany w jelicie cienkim lub grubym, przedzielone fragmentami zdrowego jelita. Od strony światła jelita najwcześniejszą zmianą są owrzodzenia błony śluzowej przypominające zmiany aftowe. W późniejszym okresie błona śluzowa jest nieregularnie obrzęknięta, a na jej powierzchni mogą być widoczne głębokie owrzodzenia o dowolnym kształcie. Typowe są linijne owrzodzenia poprzeczne i podłużne, które łącząc się ze sobą otaczają mało zmienione lub nawet niezmienione obszary śluzówki. Poprzecinana owrzodzeniami błona śluzowa może być uniesiona do góry przez obrzęk i nacieki zapalne w tkance podśluzowej, co stwarza charakterystyczny efekt „brukowania”.

ChLC nie ma takich cech mikroskopowych, które jednoznacznie pozwalałyby na ustalenie rozpoznania. W 60% przypadków w ścianie jelita są obecne charakterystyczne ziarniaki zbudowane z komórek nabłonkowatych, komórek olbrzymich wielojądrowych i limfocytów. Przy braku ziarniaków, objawem ułatwiającym rozpoznanie są szczelinowate owrzodzenia wysłane warstwą martwiczych komórek, pod którą znajduje się naciek zapalny. Z innych cech mikroskopowych należy wymienić zajęcie wszystkich warstw ściany jelita, z pogrubieniem tkanki podśluzowej.

ChLC mogą towarzyszyć objawy spoza przewodu pokarmowego. Objawy te mogą mieć charakter ogólnoustrojowy lub dotyczyć określonych układów. Spośród objawów ogólnych obserwuje się gorączkę, która może być charakterystyczna dla okresowymi znacznymi wryżkami, ale też może być tylko dyskretnie zaznaczona w sposób przewlekły, pozostając przez długi okres czasu niezauważoną [1].

Kolejnym objawem obserwowanym u pacjentów z ChLC jest utrata masy ciała dotycząca zarówno osób dorosłych, jak i dzieci [1]. Przewlekłe niedożywienie spowodowane jest zmniejszonym wchłanianiem jelitowym, zmniejszoną podażą wynikającymi z bólów brzucha oraz utraty białek w wyniku enteropatii. Innymi czynnikami wiodącymi do niedoborów żywieniowych u tych chorych jest zwiększone stężenie krążących cytokin prozapalnych oraz obniżone stężenie ILGF (insulin-like growth factor) lub somatomedyny [1].

Jednakże, mimo że niedobór masy ciała (body mass index BMI < 20 kg/m²) najczęściej towarzyszy ChLC to obserwuje się chorych z tą jednostką chorobową (około 4%, a w populacji francuskiej 8–10%) pacjentów z nadwagą i otyłością (BMI odpowiednio > 25 kg/m² oraz > 30 kg/m²). Nie zaobserwowano związku tego faktu z leczeniem steroidami tych chorych [2]. Różnicą obserwowaną w przebiegu choroby pomiędzy pacjentami o prawidłowej masie ciała, a otyłymi było częstsze występowanie zmian okołoodbytniczych, głównie ropni oraz przetok w tej drugiej grupie [3]. Fakt ten próbowano tłumaczyć zwiększoną potliwością oraz tarcieniem skóry, co może ułatwiać mecerację z wtórną infekcją bakteryjną. Dodatkowym istotnym elementem może być fakt, że tkanka tłuszczowa posiada miejscowo prozapalne działanie poprzez wzmoczoną produkcję cytokin, głównie TNF α i IL-6 [3].

Bóle i zapalenia stawów towarzyszą często ChLC, niejednokrotnie wyprzedzając w czasie objawy jelitowe choroby. Objawy stawowe są tym intensywniejsze im większa jest aktywność choroby. Obserwuje się dwie formy zajęcia stawów – pierwsza obejmująca stawy obwodowe, jak stawy skokowe, kolanowe, biodrowe, nadgarstki oraz stawy łokciowe, oraz druga – obejmująca stawy centralne, jak stawy krzyżowe, krzyżowo-biodrowe oraz zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (związane w 50–80% przypadków z obecnością HLA-B27) [4].

Zmiany śluzówkowe i skórne towarzyszące ChLC to aftowe zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, rumień guzowaty, piodermia zgorzelinowa. Rumień guzowaty (*erythema nodosum*) charakteryzuje się okresowym pojawianiem się obrączkowatych, czerwonych, bolesnych zmian o średnicy od 1 do 3 cm, głównie zlokalizowanych na wyprostnych częściach kończyn. Piodermia zgorzelinowa przebiega w postaci głębokich owrzodzeń na skórze [1].

Objawy oczne towarzyszące ChLC są wynikiem samej choroby, a czasem wywołuje je przewlekła steroidoterapia. Zapalenie nadtwardówki jest zwykle związane z aktywnością choroby i przebiega z zaczerwienieniem spojówek i twardówek, uczuciem pieczenia pod powiekami oraz światłowstrętem. Zapalenie tęczówki oraz błony naczyniowej skojarzone jest z obecnością antygeny zgodności tkankowej HLA-B27 i zwykle przebiega niezależnie od objawów jelitowych choroby [1].

Również wątroba i drogi żółciowe mogą wykazywać zmiany patologiczne w przebiegu ChLC. Wymienia się tu stłuszczenie wątroby, przebiegające bezobjawowo, ale ze zwiększonym stężeniem aminotransferaz, autoimmunologiczne zapalenie wątroby. Obserwuje się zwiększoną ilość przypadków kamicy pęcherzyka żółciowego (około 30% w przypadkach z zajęciem jelita krętego), raka pęcherzyka żółciowego oraz przypadki pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (PSC), przebiegającego czasem bezobjawowo, tylko z ewaluacją stężenia fosfatazy zasadowej (AP) oraz gammaglutamylotranspeptydazy (GGTP), a będącym kolejnym wskaźnikiem na istnienie podatności genetycznej ChLC [1].

Kolejną pozajelitową manifestacją ChLC jest kamica nerkowa, głównie szczawianowa, najprawdopodobniej

spowodowana hiperkalcemią w przebiegu długotrwałego leczenia w łóżku lub steroidoterapii [1].

Osteopenia obserwowana w przebiegu ChLC może być wynikiem zarówno samej choroby, jak i przewlekłą steroidoterapią. Osteopenia jest ważnym powikłaniem zwłaszcza w grupie pacjentów pediatrycznych, gdyż nie osiągając prawidłowej masy kostnej w okresie dzieciństwa, są oni bardziej narażeni na złamania w wieku dorosłym.

Groźnym, ale rzadkim następstwem długotrwałej choroby Leśniowskiego-Crohna jest skrobiawica ze wszystkimi konsekwencjami zajęcia narządów mięsnych [5].

Cel pracy

Celem pracy było ustalenie czy w badanej populacji polskiej 150 osób z potwierdzoną chorobą Leśniowskiego-Crohna, występowanie objawów spoza przewodu pokarmowego ma związek z obecnością wariantu mutacji *NOD2/CARD15*.

Materiał i metody

Materiałem do analizy mutacji i polimorfizmu genów odpowiedzialnych za wywoływanie ChLC, w tym także *NOD2/CARD15* u człowieka był DNA izolowany z leukocytów krwi obwodowej. Badaniem objęto pacjentów z potwierdzoną histopatologicznie, radiologicznie lub w materiale operacyjnym chorobą. Chorzy ci pozostawali pod opieką Poradni Gastroenterologii i Żywienia Człowieka oraz Katedry i Kliniki Gastroenterologii w latach od 1995 do 2004 roku.

U wszystkich pacjentów dokonano oceny na podstawie badania podmiotowego, ze szczególnym uwzględnieniem opracowanej na potrzeby tego badania ankiety, w której uwagę zwrócono na elementy istotne u chorych z ChLC, jak: czas i podstawy rozpoznania choroby, zajęty odcinek przewodu pokarmowego, występowanie objawów spoza przewodu pokarmowego, wywiad dotyczący używek (głównie tytoniowy).

W badaniu przedmiotowym poza standardową oceną, określano: indeks masy ciała (BMI), obecność i jakość perystaltyki, obecność oporów patologicznych w obrębie jamy brzusznej, cech niedokrwistości.

U każdego pacjenta obliczano indeks aktywności choroby Crohna (CAI – Crohn's disease activity index). Indeks ten uwzględnia trzy elementy z wywiadu w ciągu 7 dni poprzedzających badanie: liczba luźnych stolców, obecność i nasilenie bólów brzucha w skali trzypunktowej oraz ogólne samopoczucie w skali czteropunktowej. Dalej odnotowuje się istnienie objawów dodatkowych, jak: zapalenie tęczówki, zapalenie błony naczyniowej oka, rumień pierścieniowy, piodermia zgorzelinowa, aftowe zapalenie jamy ustnej, bóle i zapalenie stawów, szczelina, przetoka lub ropień okołoodbytny, obecność innych przetok, temperatura powyżej 37,5°C. Uwzględnia się też, na podstawie badania przedmiotowego, obecność oporów patologicznych w badaniu palpacyjnym brzucha, wartość hematokrytu oraz masę ciała, znając masę należną dla przedziału wiekowego, wzrostu i płci pacjenta. Na podstawie tego indek-

su oceniano przebieg choroby jako lekki (ilość punktów poniżej 150), średnio ciężki (zakres punktacji między 150, a 400) i ciężki (powyżej 400 punktów).

Po wyrażeniu i podpisaniu zgody na badanie, u każdego z pacjentów pobierano krew: 10 ml na EDTA (do izolacji DNA). Krew w probówkach z EDTA dokładnie mieszano i transportowano do Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk (PAN) w Poznaniu, gdzie rozpoczynano izolację DNA do dalszych badań genetycznych tych pacjentów.

Analizę molekularną genu *NOD2/CARD15* wykonano dla 150 chorych z ChLC.

Metody analizy molekularnej

W analizie badanego materiału stężenie DNA określano przez pomiar spektrofotometryczny absorpcji wodnego roztworu DNA przy długości fali 260 nm i 320 nm (linia podstawowa) i drodze optycznej 1 cm. Stężenie obliczano wg wzoru:

$$C = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{rozcieńczenie}$$

gdzie: C – stężenie DNA ($\mu\text{g/ml}$)

($A_{260} - A_{320}$) – absorbancja DNA

50 ($\mu\text{g/ml}$) – stężenie DNA odpowiadające 1 OD

Stopień zanieczyszczenia preparatów DNA białkiem określano na podstawie stosunku absorbancji A_{260} (maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych) do A_{280} (maksimum absorpcji dla białek).

20 μl mieszaniny reakcyjnej zawierało: 125 ng genomowego DNA, po 15 pmoli starterów F i R, 0,5 mM dNTP, 1,5 U polimerazy Taq. Warunki reakcji: denaturacja wstępna 92°C, 5 min; 30 cykli: denaturacja 92°C, 45 s, wiązanie starterów 55°C, 45 s, synteza 72°C, 90 s; synteza końcowa 72°C, 5 min.

4 μl produktu PCR i z 6 μl buforu obciążającego z formamidem (1.4.5), denaturowano 5 minut w temperaturze 95°C, a następnie przenoszono na lód. Na żel (1.6.2) o wymiarach 20 x 20 x 0,1 cm nakładano po 8 μl . Detekcję DNA prowadzono metodą srebrzenia (2.5).

Przygotowanie żelu po elektroforezie

1. Umieszczono żel w naczyniu szklanym lub plastikowym, w 300 ml 10% etanolu i łagodnie kołysano przez 15 minut.

2. Wylano etanol i przepłukano żel wodą.

3. Dodano 300 ml 1% kwasu azotowego i inkubowano z łagodnym kołysaniem przez 10 minut.

4. Wylano kwas i przepłukano żel wodą.

Barwienie

5. Do 300 ml 0,2% azotanu srebra dodano 300 μl formaldehydu. Dobrze wymieszano i wylano do naczynia z żelem. Inkubowano z łagodnym kołysaniem przez 30 minut.

6. Wylano azotan srebra. Żel dokładnie płukano, kilka razy w dużej objętości wody.

Wywoływanie

7. Przygotowano 1000 ml 3% roztworu węglanu sodu z dodatkiem 500 μl formaldehydu. Dodawano roztwór porcjami (ok. 100 ml) do żelu. Roztwór wymieniało na świeży, gdy zaczynał ciemnieć.

Przerwanie reakcji i utrwalanie

8. Płukano żel 10 minut w 10% kwasie octowym, a następnie 2x w wodzie.

Żel przeniesiono na wilgotną bibułę Whatman 3 mm i przykryto dobrze namoczoną folią celofanową. Suszono żel w suszarce próżniowej w temperaturze 80°C, 45 minut.

Do 100 μl produktu PCR dodano 100 μl buforu do przemywania kolumny (3.4.12) oraz 1 ml żywicy (Wizard™, Promega), dokładnie mieszano przez 20 s i przesączono przez kolumnę. Następnie kolumnę przepłukiwano 2 ml 80% izopropanolu. Odwirowywano pozostały na kolumnie izopropanol 20 s, 10000 rpm. Oczyszczony produkt PCR eluowano z kolumny 50 μl wody, inkubując 15 minut, a następnie odwirowywano 20 s, 10000 rpm.

Do 5 μl oczyszczonego produktu PCR dodawano 4 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej nukleotydy i enzym, 20 μl H₂O, 10 pmoli (1 μl) znakowanego fluorescencyjnie Cy5 startera. Po 6 μl mieszaniny przenoszono do probówek zawierających 2 μl odpowiednich nukleotydów terminujących i przeprowadzono reakcję PCR w następujących warunkach: 94°C, 90 s; 20 cykli: 94°C, 30 s, 55°C, 30 s, 72°C, 30 s; 72°C, 3 minuty. Po zakończeniu PCR dodawano 4 μl buforu stop. Próby denaturowano 5 minut w temperaturze 95°C, przenoszona na lód, następnie po 3,5 μl mieszaniny nakładano na żel sekwencyjny (1.6.4) i rozdzielano elektroforetycznie na sekwenatorze AlfExpress w warunkach: 1500 V, 60 mA, 25 W, 10 godzin. Wynik sekwenjonowania analizowano przy pomocy programu Alf Manager V3.02.

Wyniki

Analizie molekularnej poddano eksony 4, 8, 9 i 11, jako te, w których najczęściej obserwuje się zmiany *NOD2/CARD15* wśród populacji rasy białej (kaukazkiej) regionu Europy i Ameryki Północnej.

W analizie molekularnej we fragmencie eksonu 4a genu *NOD2/CARD15* stwierdzono wystąpienie odmiennego od kontroli wzoru prążków SSCP. Opisująca mutacja okazała się być najczęściej obserwowanym wariantem mutacji *NOD2/CARD15* wśród chorych z ChLC w polskiej populacji. Do analizy włączono również DNA pochodzące od członków rodziny. Sekwencjonowanie wykazało występowanie wariantu sekwencji 802C > T, powodującego zmianę 268 proliny w serynę (ryc. 1.).

Analiza sekwencyjna fragmentu a eksonu 4 potwierdziła występowanie u chorych z ChLC, o pochodzeniu polskim, mutacji 802C > T powodującej zmianę 268 proliny w serynę. Zbadano 300 alleli, gdzie allel C występował z częstością 0,505, allel T – 0,495. Dla porównania zbadano również występowanie tej mutacji w grupie populacyjnej zbadano 200 alleli, gdzie allel C występował z częstością 0,68, allel T 0,32 (ryc. 2., tab. 1.).

Analiza produktów PCR eksonu 9 i 11 metodą SSCP w warunkach temperatury pokojowej nie wykazała występowania zmian w badanych próbach. Ta sama analiza przeprowadzona w 20°C wykazała występowanie odmiennych wzorów prążków SSCP w 17,2% próbach, na badanych 150 pacjentów w badanym eksonie 11 (ryc. 2. i 3.). Mutacja 3020insC powoduje zmianę o charakterze insercji ramkowej w pozycji 1007 produktu białkowego. Dalsza analiza pozwoliła zaobserwować, że w badanej populacji polskiej, wszyscy chorzy z rozpoznaną ChLC, u których zidentyfikowano wariant mutacji 3020insC są jednocześnie nosicielami najczęściej opisywanego w badanej populacji wariantu mutacji 802C > T, co w sumie pozwala na stwierdzenie, że w 14,9% badanych chorych z ChLC wykazuje obecność jednocześnie dwóch wariantów mutacji *NOD2/CARD15*.

Najczęściej obserwowanym wariantem mutacji *NOD2/CARD15* wśród badanej populacji polskiej chorych z ChLC jest obserwowany we fragmencie a eksonu 4 wariant 802C > T (P268S). W badanej grupie chorych stwierdzono obecność tego wariantu u 49,5% chorych. Analizując dalej, postać heterozygotyczna dotyczyła 33,03%, a homozygotyczna występowała u 16,51% badanych chorych (ryc. 4.).

Jednoczesna analiza grupy kontrolnej potwierdziła występowanie opisywanego wariantu mutacji wśród 32,4% osób, niespokrewnionych z badanymi pacjentami z ChLC oraz jednocześnie nie będących obciążonymi chorobami ze strony przewodu pokarmowego. Większość, bo aż 28,2% z badanej grupy kontrolnej wykazywało się obecnością tylko jednego zmutowanego allelu (heterozygota), a tylko 4,2% badanych prezentowało obecność obu nieprawidłowych alleli (homozygota).

W dalszej analizie badano współlistnienie wariantu mutacji 802C > T (P268S) wraz z występowaniem objawów spoza przewodu pokarmowego. Analizę przeprowadzono stosując test χ^2 Pearsona dla zmiennych nieparametrycznych.

Ponownie dokonano podziału chorych nosicieli mutacji w pozycji 802C > T na homozygotów, heterozygotów, porównując obie grupy z pacjentami bez opisywanej mutacji pod względem występowania objawów spoza przewodu pokarmowego, konieczności i rodzaju zabiegu operacyjnego, stosując analizę χ^2 Pearsona. Z poczynionych obserwacji wynika, że u homozygot, nosicieli wariantu mutacji 802C > T znacznie częściej stwierdza się istnienie objawów spoza przewodu pokarmowego, takich jak: zmiany stawowe ($p = 0,04$, $\chi^2 = 6,8$, $C = 0,43$) – rycina 5, zapalenie tęczówki ($p = 0,024$, $\chi^2 = 7,39$, $C = 0,27$) – rycina 6 oraz obecność rumienia guzowatego ($p = 0,037$, $\chi^2 = 5,8$, $C = 0,24$) – rycina 7.

W tabelach 2., 3. i 4. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów a także wartości predykcijnej dodatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 802C > T (tabela 2.) z uwzględnieniem podziału na chorych nosicieli homo- i heterozygotycznych (tabela 3. i 4.) w odniesieniu do zmian stawowych.

W tabelach 5., 6. i 7. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów, a także wartości predykcijnej

dotatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 802C > T (tabela 5.) z uwzględnieniem podziału na chorych nosicieli homo- i heterozygotycznych (tabela 6. i 7.) w odniesieniu do zapalenia tęczówki.

W tabelach 8., 9. i 10. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów a także wartości predykcijnej dodatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 802C > T (tabela 8.) z uwzględnieniem podziału na chorych nosicieli homo- i heterozygotycznych (tabela 9. i 10.) w odniesieniu do rumienia guzowatego.

Poddano dalej analizie współwystępowanie mutacji 1007fsins (3020insC) z poprzednio udokumentowaną, najczęściej występującą mutacją 802C > T (P268S), z uwzględnieniem podziału wśród pacjentów z wariantem 802C > T na heterozygoty i homozygoty. Okazało się, że występowanie mutacji „ramkowej” jest jednoznaczne niemalże z występowaniem mutacji w pozycji 802C > T ($p = 0,001$, $\chi^2 = 13,79$, $C = 0,35$, gdzie C oznacza współczynnik kontyngencji, określający siłę zależności) co przedstawiono na rycinie 8.

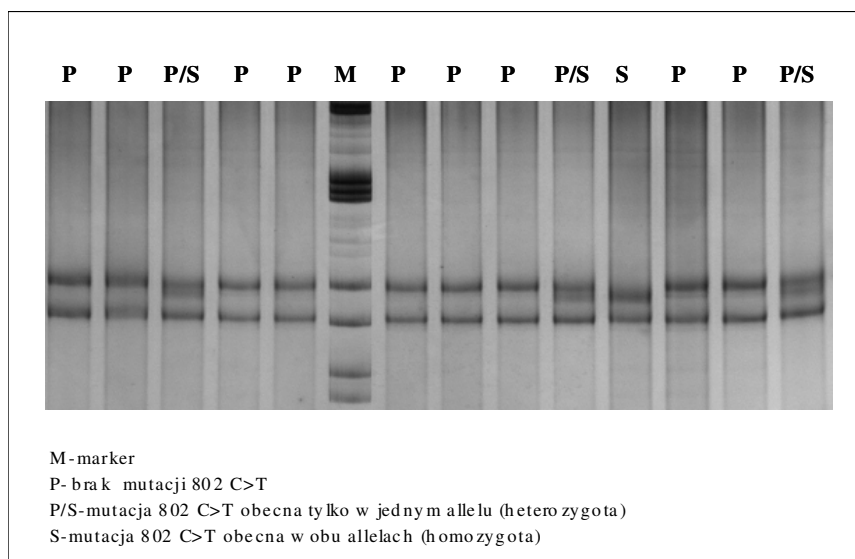
W tabelach 12. i 13. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów, a także wartości predykcijnej dodatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 1007_{fs}ins oraz 802C > T (tabela 11.) z uwzględnieniem podziału na chorych nosicieli homo- i heterozygotycznych (tabela 12. i 13.).

Wydaje się, że w związku z obecnością mutacji 1007fsins (3020insC) tylko w 0,7% grupy kontrolnej, to właśnie ten wariant mutacji może stanowić istotny wykładnik predysponujący do rozwoju ChLC, poddano więc analizie występowanie cech, takich jak wiek, w którym ujawniły się objawy choroby, ciężkość jej przebiegu, konieczność zabiegów chirurgicznych, występowanie NZChJ wśród krewnych I stopnia oraz obecność objawów spoza przewodu pokarmowego u chorych nosicieli mutacji zmieniającej ramkę odczytu.

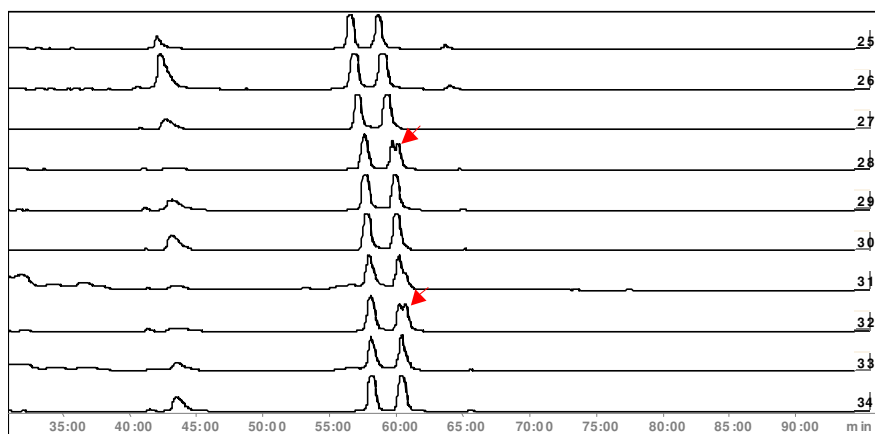
Podobnie, znamienne częściej z tym wariantem mutacji występowały zmiany spoza przewodu pokarmowego, takie jak zapalenie tęczówki ($p = 0,048$, $\chi^2 = 3,9$, $C = 0,19$, gdzie C oznacza współczynnik kontyngencji, określający siłę zależności), co przedstawiono na rycinie 9. oraz rumień guzowaty ($p = 0,01$, $\chi^2 = 6,59$, $C = 0,24$), co przedstawiono również na rycinie 10.

W tabeli 14. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów a także wartości predykcijnej dodatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 1007_{fs}ins (tabela 14.) w odniesieniu do zapalenia tęczówki.

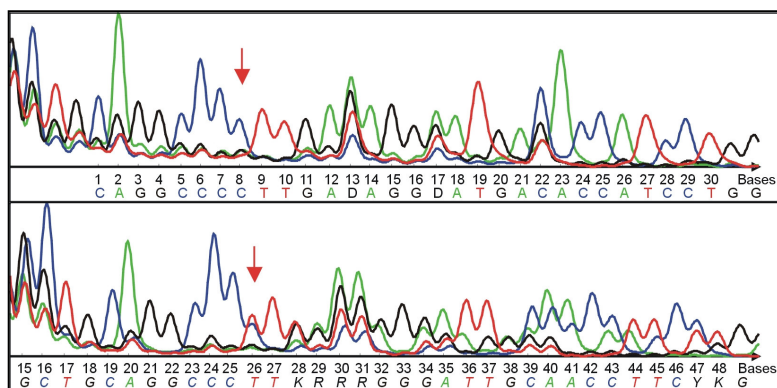
W tabeli 15. przedstawiono czułość i swoistość przeprowadzonych testów a także wartości predykcijnej dodatniej i ujemnej oraz obliczono prewalencję (chorobowość) analizowaną i rzeczywistą dla grup chorych z mutacją 1007_{fs}ins (tabela 15.) w odniesieniu do rumienia guzowatego.



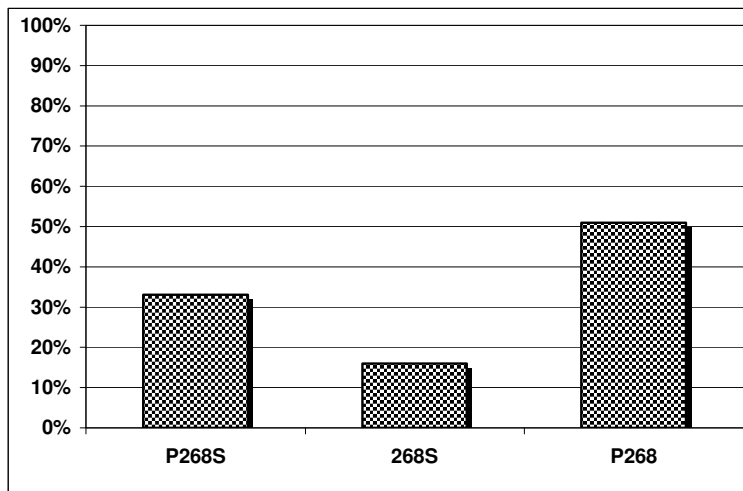
Ryc. 1. Identyfikacja wariantu sekwencji 802C > T w eksonie 4 genu NOD2/CARD15 metodą PCR-SSCP (The identification of gene NOD2/CARD15 mutation variant 802C > T in exon 4 by PCR-SSCP).



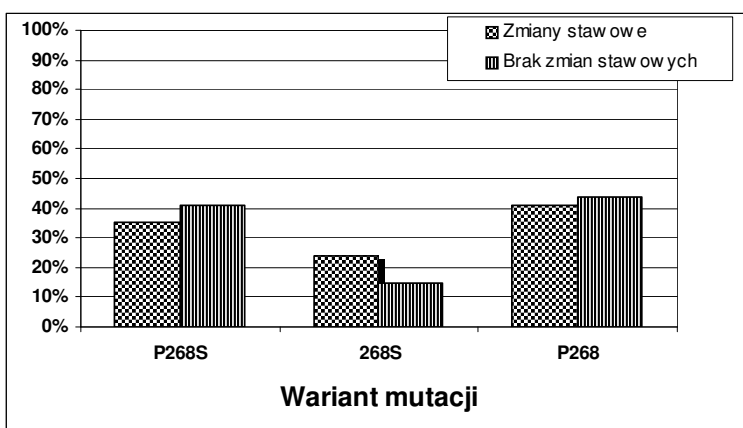
Ryc. 2. Przykład analizy eksonu 11 genu NOD2/CARD15 metodą PCR-SSCP. Około 60. minuty rozdzieli wierzchołki charakterystyczne dla prążków SSCP. Na torach 28 i 32 widoczne dodatkowe wierzchołki (The example of exon 11 analyse of NOD2/CARD15 gene by PCR-SSCP. On the 28 and 32 tracks additional hills were observed).



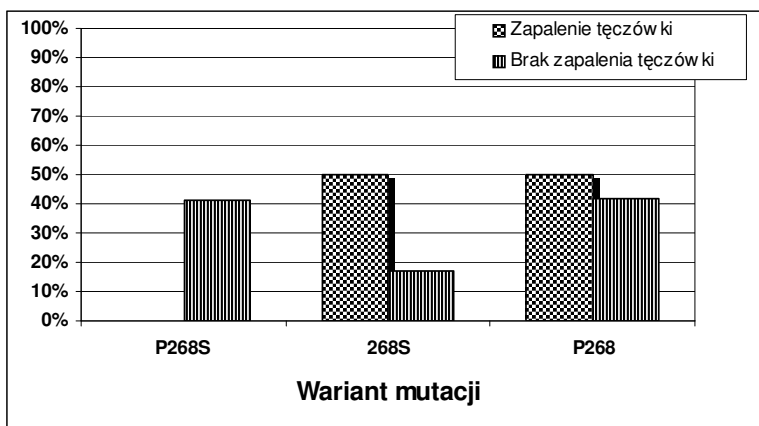
Ryc. 3. Detekcja i identyfikacja wariantu 3020insC mutacji NOD2/CARD15 w eksonie 11 metodą PCR-SSCP z następnym sekwencjonowaniem (Identyfikacja mutacji metodą sekwencjonowania cyklicznego przy pomocy sekwenatora Alf-Express. Detection and identification of 3020insC mutation of gene CARD15/NOD2 by PCR-SSCP).



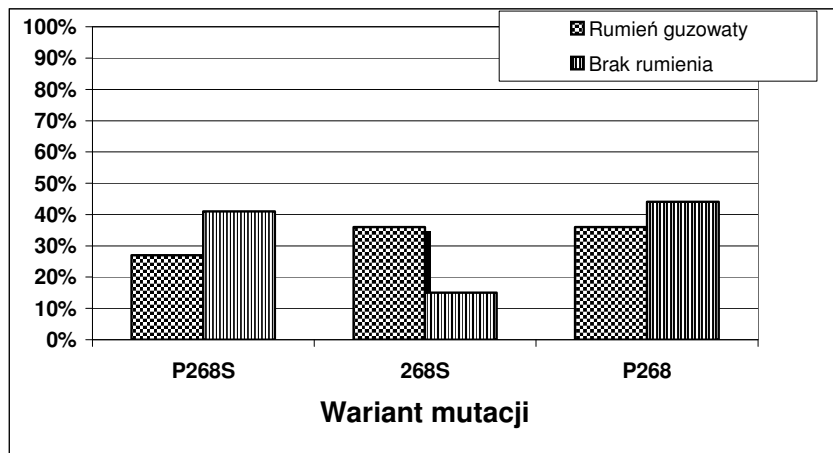
Ryc. 4. Występowanie wariantu mutacji 802C > T (P268S) u chorych z ChLC w populacji polskiej (P268S- heterozygota, 268S- homozygota, P268- brak mutacji) (The incidence of 802C > T mutation variant in patients with Crohn's disease in Polish population (P268-heterozygote, 268S-homozygote, P268-no mutation).



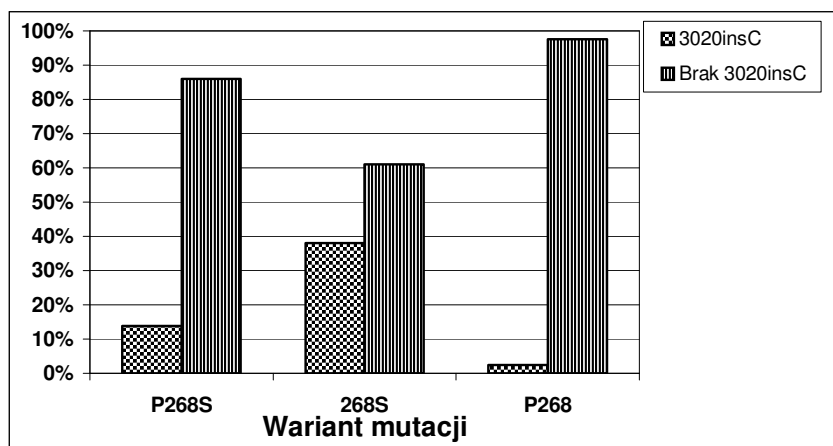
Ryc. 5. Występowanie zmian stawowych u chorych z ChLC w zależności od obecności mutacji 802C > T z uwzględnieniem podziału na heterozygoty (P268S) i homozygoty (268S) w porównaniu z chorymi bez mutacji (p268) (The incidence of arthritis in Crohn's disease patients depending on the presence of 802C > T mutation (hetero- and homozygote) in comparing with patients without mutation).



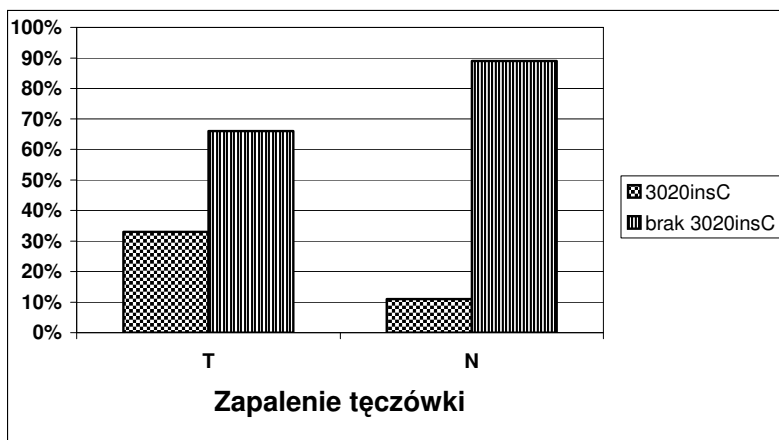
Ryc. 6. Występowanie zapalenia tęczówki u chorych z ChLC w zależności od obecności mutacji 802C > T z uwzględnieniem podziału na heterozygoty (P268S) i homozygoty (268S) w porównaniu z chorymi bez mutacji (P268) (The incidence of iritis in Crohn's disease patients depending on the presence of 802C > T mutation (hetero- and homozygote) in comparing with patients without mutation).



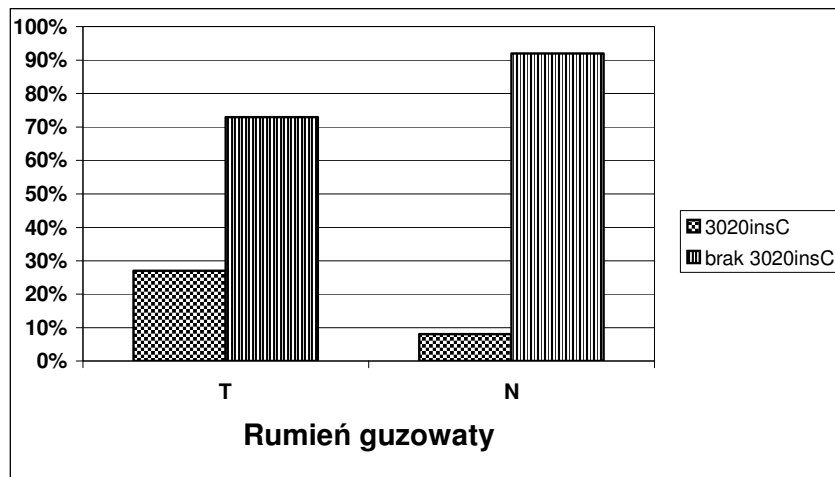
Ryc. 7. Występowanie rumienia guzowatego u chorych z ChLC w zależności od obecności mutacji 802 C > T z uwzględnieniem podziału na heterozygoty (P268S) i homozygoty (268S) w porównaniu z chorymi bez mutacji (P268) (The incidence of erythema nodosum in Crohn's disease patients depending on the presence of 802C > T mutation (hetero- and homozygote) in comparing with patients without mutation).



Ryc. 8. Współwystępowanie mutacji 1007fsins (3020insC) z mutacją 802C > T z uwzględnieniem podziału na heterozygoty (P268S), homozygoty (268S) i chorych bez mutacji (P268) (The coincidence of 1007fsins (3020insC) and 802C > T mutation (hetero- and homozygote) in comparison with patients without mutation).



Ryc. 9. Występowanie zapalenia tęczówki u chorych z ChLC nosicielami mutacji 1007fsins (3020insC) oraz bez tego wariantu (The incidence of iritis in Crohn's disease patients with 1007fsins mutation variant in comparison with patients without mutation).



Ryc. 10. Występowanie rumienia guzowatego u chorych z ChLC nosicielami mutacji 1007fsins (3020insC) oraz bez tego wariantu (The incidence of uveitis in Crohn's disease patients with 1007fsins mutation variant in comparison with patients without mutation).

Tab. 1. Zestawienie częstości występowania allelu C i T u chorych z ChLC i populacji polskiej (The frequency of allele C and T presence in patients with Crohn's disease in Polish population)

	Chorzy z ChLC			Grupa populacyjna		
	Ilość przypadków	Częstość genotypu	Liczba alleli	Ilość przypadków	Częstość genotypu	Liczba alleli
C/C	76	0,505	152	68	0,68	136
C/T	48	0,330	96	28	0,28	56
T/T	26	0,165	52	4	0,04	8
Suma	150	1,0	300	100	1,0	200

Tab. 2. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C >T w przewidywaniu zmian stawowych (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C >T mutation variant in prediction of arthritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
59,2%	43,9%	55,7%	47,4%	56,7%	54,4%

Tab. 3. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u homozygot w przewidywaniu zmian stawowych (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation variant (homozygote) in prediction of arthritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
54,5%	25,0%	66,6%	47,4%	20,0%	46,7%

Tab. 4. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u heterozygot w przewidywaniu zmian stawowych (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation variant (heterozygote) in prediction of arthritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
45,9%	51,4%	50,0%	51,4%	37,8%	41,1%

Tab. 5. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T w przewidywaniu wystąpienia zapalenia tęczówki (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation variant in prediction of iritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
50,0%	41,5%	7,6%	89,5%	57,8%	8,9%

Tab. 6. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u homozygot w przewidywaniu wystąpienia zapalenia tęczówki (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation (homozygote) variant in prediction of iritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
50,0%	70,8%	22,2%	89,5%	20,0%	8,9%

Tab. 7. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u heterozygot w przewidywaniu wystąpienia zapalenia tęczówki (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation (heterozygote) variant in prediction of iritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
0%	50,0%	0%	89,5%	37,8%	4,4%

Tab. 8. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T w przewidywaniu wystąpienia rumienia guzowatego (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation variant in prediction of erythema nodosum)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
63,6%	44,1%	26,9%	78,9%	57,7%	24,4%

Tab. 9. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u homozygot w przewidywaniu wystąpienia rumienia guzowatego (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation (homozygote) variant in prediction of erythema nodosum)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
50,0%	75,0%	44,4%	78,9%	20,0%	17,8%

Tab. 10. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 802C > T u heterozygot w przewidywaniu wystąpienia rumienia guzowatego (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 802C > T mutation (heterozygote) variant in prediction of erythema nodosum)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
42,8%	51,7%	17,6%	78,9%	37,8%	15,5%

Tab. 11. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 1007fsins w przewidywaniu wystąpienia wariantu mutacji 802C > T (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 1007fsins in prediction of 802C > T mutation variant)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
22,2%	97,5%	92,3%	48,1%	14,4%	6,0%

Tab. 12. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu 1007fsins w przewidywaniu wystąpienia wariantu homozygoty mutacji 802C > T (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 1007fsins in prediction of 802C > T mutation variant in homozygote)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
38,8%	97,5%	87,5%	78,0%	8,0%	20,0%

Tab. 13. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu 1007fsins w przewidywaniu wystąpienia wariantu heterozygoty mutacji 802C > T (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 1007fsins in prediction of 802C > T mutation variant in heterozygote)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
13,9%	97,5%	83,3%	55,7%	6,7%	40,0%

Tab. 14. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 1007fsins w przewidywaniu zapalenia tęczówki (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 1007fsins in prediction of iritis)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
33,3%	89,5%	23,1%	93,4%	12,5%	8,6%

Tab. 15. Wartości czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV), chorobowości analizowanej (AP) i chorobowości rzeczywistej (TP) dla obecności wariantu mutacji 1007fsins w przewidywaniu wystąpienia rumienia guzowatego (Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as analysed and real morbidity for the presence of 1007fsins in prediction of erythema nodosum)

Czułość	Swoistość	PPV	NPV	AP	TP
26,9%	92,3%	53,8%	79,1%	12,5%	25,0%

Podsumowanie wyników:

Na podstawie przeprowadzonych badań i analizy statystycznej uzyskano następujące wyniki:

- W badanej populacji polskiej pacjentów z ChLC najczęściej obserwowanym wariantem mutacji *NOD2/CARD15* jest zmiana w pozycji 802C > T (Pro268Ser) – dotyczy to 49,5% badanych chorych
- W badanej populacji wykazano współwystępowanie mutacji 802C > T (Pro268Ser) i 1007fsins (3020insC), przy czym u każdego chorego z obecną mutacją zmieniającą ramkę odczytu 1007fsins (3020insC) wykazano równoległe występowanie mutacji 802C > T (Pro268Ser)
- U chorych będących homozygotami dla opisywanej cechy 802C > T (268Ser) stwierdzono znamienne statystycznie występowanie młodszego wieku, w którym ujawniły się pierwsze objawy choroby oraz znamienne częściej występujących objawów spoza przewodu pokarmowego:
 - zapalenie stawów
 - zapalenie tęczówki
 - zmian skórnych (rumień guzowaty).

Wnioski

1. Obecność wariantu mutacji 802C > T w obu allelach warunkuje wystąpienie pierwszych objawów choroby we wcześniejszym wieku oraz zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zmian stawowych, zapalenia tęczówki oraz rumienia guzowatego u chorych z ChLC w badanej populacji.
2. Drugim, co do częstości występowania wariantem mutacji genu *NOD2/CARD15* w badanej populacji jest 1007_{fs}ins.
3. Obecność wariantu mutacji 1007_{fs}ins zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia tęczówki i rumienia guzowatego u chorych z ChLC w badanej populacji.
4. Obecność wariantu mutacji 1007_{fs}ins współistnieje z wariantem 802C > T u wszystkich chorych z ChLC w badanej populacji.

Dyskusja

W naszych badaniach wśród chorych z ChLC obecność jednego z wariantów mutacji *NOD2/CARD15* 802C > T stwierdzono u blisko 50% badanych. I, mimo że obecność tego samego wariantu stwierdzono w wysokim procencie grupy kontrolnej (32%, ale tylko u 4% mutacja dotyczyła obu alleli), co może przemawiać za nie-

wielkim wpływem akurat tego wariantu na wystąpienie objawów choroby, może on stanowić jeden z elementów w poligenicznym mechanizmie etiopatogenezy tej choroby. Dowodem, który wydaje się jednak przemawiać za istotną rolą tego wariantu mutacji w populacji polskiej są wyniki analizy związku obecności tego wariantu z obrazem klinicznym choroby wśród chorych.

Kolejnym dowodem powyższej tezy jest też częstsze występowanie u homozygot objawów spoza przewodu pokarmowego, takich jak: zapalenie stawów, zapalenie tęczówki oraz zmian skórnych w postaci rumienia guzowatego.

Analizowano czułość, swoistość oraz wartości predykcji dodatniej i ujemnej dla wystąpienia zmian stawowych. Uzyskano czułość testu rzędu 59,2%, przy swoistości 43,9%, a wartości predykcji dodatniej u homozygot wyniosły 66,6%. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że wartość badania wariantu mutacji *NOD2/CARD15* w stosunku do wystąpienia zmian stawowych u chorych z ChLC może mieć średnie znaczenie, mimo że rzeczywista prevalencja jest dość wysoka i wynosi 54,4%, co oznacza, że te zmiany spoza przewodu pokarmowego u chorych występują stosunkowo częściej w porównaniu z innymi objawami, jak zapalenie tęczówki 8,9%, czy występowanie rumienia guzowatego 17,8%. W przypadku analizy wartości badania mutacji przy przewidywaniu wystąpienia zapalenia tęczówki u pacjentów z ChLC u homozygot stwierdzono wysokie wartości swoistości testu (70,8%), podczas gdy czułość określono na 50,0%. Wysokie też otrzymano wartości predykcji ujemnej (89,5%), co wskazuje na małe prawdopodobieństwo wystąpienia tego objawu u chorych heterozygot. Interesującą wydaje się być poczyniona obserwacja, że w prawdzie u heterozygot nie obserwowano w naszych badaniach zapalenia tęczówki, to występowało ono wśród chorych bez obecnego wariantu 802C > T genu *NOD2/CARD15*. Na pewno częściowo można to zjawisko wyjaśnić faktem, że również obecność innego wariantu mutacji 1007_{fs}ins genu *NOD2/CARD15* wiąże się ze znamienne wyższą częstością występowania zapalenia tęczówki, a współwystępowanie obu wariantów mutacji w badanej populacji wynosi 97,5%, a więc możliwym jest, że koincydencja obu wariantów warunkuje wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia tęczówki u chorych z ChLC, nosicieli obu wariantów mutacji. Podczas dalszej analizy, tym razem dotyczącej wartości badania mutacji w przewidywaniu wystąpienia rumienia guzowatego, uzyskano dość wysokie wartości swoistości (75,0%) dla homozygot, przy czułości rzędu 50,0% i wysokich wartościach predykcji ujemnej (78,9%), co wskazuje, że mało prawdopodobnym jest wystąpienie tych zmian skórnych u chorych nie będących nosicielami mutacji w genie *NOD2/CARD15*. I w tym przypadku również wykazano znamienne statystyczną wyższą częstość występowania opisywanej cechy u chorych z wariantem mutacji 1007_{fs}ins, co wskazywać może na fakt, że koincydencja

obu wariantów zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia rumienia guzowatego u chorych z ChLC.

Podobne wyniki, ale nie w grupie chorych będących nosicielami wymienionej cechy w obu allelach przedstawia w swej pracy Orchard i wsp. [6], dowodząc, że obecność rumienia guzowatego, zapalenia tęczówki oraz zmian stawowych często zdarzają się równolegle i są głównie obserwowane wśród kobiet pacjentów z ChLC, co może mieć związek z mutacją genów w regionie HLA i jej koincydencji z obecnością mutacji *NOD2/CARD15*.

W celu próby wyjaśnienia tego zjawiska uzasadnionym wydaje się kontynuacja badań w zakresie innych jeszcze genów. Na pewno dalsze badania molekularne w tej grupie pacjentów powinny dotyczyć analizy współwystępowania dodatkowych mutacji, takich jak w chromosomie 5 (5q31: nonsensowna substytucja w *SLC22A4* oraz transpozycja G > C w *SLC22A5*), o nazwie loci *IBD5*, które to zmiany wpływają na nieprawidłowy przepływ poprzez organiczny kanał kationowy [7] oraz w chromosomie 10 (10q23), która to mutacja (*DLG5*) powoduje defekt produktu białkowego odpowiedzialnego za utrzymanie integralności komórek epitelium [8]. Istotnym wydaje się też dodatkowe genotypowanie w regionie HLA.

Piśmiennictwo

- Hendrikson B.A., Gokhale R., Cho J.H.: Clinical aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Microb. Rev.*, 2002, 79–94.
- Mingrone G., Benedetti G., Capristo E., De Gaetano A., Greco A.V., Tataranni P.A., Gasbarrini G.: Twenty-four hours energy balance in Crohn disease patients: metabolic implications of steroid treatment. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67, 118–123.
- Blain A., Cattani S., Beaugerie L., Carbonnel F., Gendre J.P., Cosnes J.: Crohn's disease clinical course and severity in obese patient. *Clin. Nutr.*, 2002, 21(1), 51–57.
- Mallas E.G., Mackintosh P., Asquith P., Cooke W.T.: Histo-compatibility antigens in inflammatory bowel disease. Their clinical significance and their association with arthropathy with special reference to HLA-B27 (W27). *Gut*, 1976, 43, 906–910.
- Bartnik W.: Przewodnik po nieswoistych chorobach jelit, 2002.
- Orchard T.R., Chua C.N., Ahmad T., Cheng H., Welsh K.I., Jewell D.P.: Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology*, 2002, 123, 714–718.
- Peletkova V.D., Wintle R.F., Rubin L.A., Amos C.I., Huang Q., Gu X., Newmann B., Van Oene M., Cescon D., Greenberg G., Griffiths A.M., St George-Hyslop P.H., Siminovich K.A.: Functional variants of OCTN cation transporter are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.*, 2004, 36, 471–475.
- Stoll M., Corneliussen B., Costello C.M., Waetzig G.H., Mellgard B., Koch W.A., Rosenstiel P., Albrecht M., Croucher P.J.P., Seegert D., Nikolaus S., Hampe J., Lengauer T., Pierrou S., Foelsch U.R., Mathew C.G., Lagerstrom-Fermer M., Schreiber S.: Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.*, 2004, 36, 476–480.