



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**



Mihail-Virgil BOLDEANU

**STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC ȘI IMUNOLOGIC
AL BOLILOR INFLAMATORII INTESTINALE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Tudorel CIUREA

Craiova

2014

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

Mihail-Virgil BOLDEANU

**STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC ȘI IMUNOLOGIC
AL BOLILOR INFLAMATORII INTESTINALE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Tudorel CIUREA

Craiova

2014

LISTĂ DE ABREVIERI

<i>MMP</i>	Matrix metalloproteinases, metaloproteinaze matriceale
<i>IL</i>	Interleukine
<i>CRP</i>	Proteina C reactivă
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>IBD1</i>	Identity By Descent
<i>NOD2/CARD 15</i>	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2 / Caspase-Activating Recruitment Domain 15
<i>GWAS</i>	Genome-wide association studies, studii de asociere la nivelul intregului genom,
<i>OCTN</i>	Organic cation transporter
<i>DLG</i>	Drosophila Large Discs Homologue
<i>MDR</i>	Multidrug resistance
<i>ICAM</i>	Moleculele de adeziune intercelulară
<i>TGF β</i>	Transforming growth factor beta
<i>TNF α</i>	Tactorul de necroză tumorală alfa
<i>CCR</i>	Receptori ai chemokinelor
<i>CD</i>	Cluster designation
<i>ROC</i>	Receiver-operator characteristic

INTRODUCERE

Bolile inflamatorii intestinale (BII) sunt, în termeni generali afecțiuni cronice, inflamatorii idiopatice, ale căror efecte primare se observă în cadrul tractului gastro-intestinal, dar pot avea de asemenea manifestări grave extraintestinale. BII sunt afecțiuni inflamatorii progresive, recurente, de etiologie necunoscută, ce afectează în special populația tânără, activă socio-profesional. Influențează calitatea vieții ducând la invalidități cronice și costuri mai mari ale sistemelor de sănătate.

BII reprezintă afecțiuni care pot apărea în orice moment de-a lungul vieții, din copilărie până la vârsta adultă, deși sunt studii care arată că peste 80% din cazuri sunt diagnosticate în prezent în cea de a doua sau a treia decadă de viață. BII au o incidentă și o prevalență în creștere la nivel mondial, în special în țările occidentale fiind în strânsă legătură cu progresele socio-economice.

Elucidarea factorilor imunologici și genetici, cu rol important în patogeneză acestor afecțiuni, indică mai multe puncte unde cascada inflamatorie poate fi întreruptă, rezultând posibilitatea de terapii țintite pentru BII. Astfel, descoperiri recente au condus la apariția de noi medicamente terapeutice care reglează activarea răspunsului imun celular și inflamația mucoasei intestinale (terapia biologică cu *anticorpi anti factorul de necroză tumorală alfa*, anti-TNF α , asociată imunosupresoarelor). Această terapie biologică a schimbat abordarea pacientului, stabilindu-se noi obiective terapeutice care să ducă la vindecarea mucosală și modificarea istoriei naturale a bolii.

Toate aceste progrese înregistrate în ultimii ani în domeniul imunologiei și geneticii, alături de noile tehnici endoscopice și metodele minim invazive de diagnostic, ajută în definirea corectă a fenotipului de boală și în conturarea unor noi sisteme de clasificare a BII care să cuprindă pe lângă clasificarea clinică și datele serologice și genetice noi descoperite.

Tema de cercetare propusă este de actualitate și prezintă un deosebit interes științific pentru că realizează o analiză complexă din punct de vedere epidemiologic, fenotipic și serologic a pacienților cu boli inflamatorii intestinale. Originalitatea studiului constă în determinarea profilului serologic al pacienților, asocierea între dinamica concentrațiilor serice ale acestor markeri serologici și diferitele fenotipuri clinice de boală și prezența de corelații între activitatea bolilor inflamatorii intestinale la adulți și concentrațiile serice ale MMP. Datorită sensibilității și specificității superioare, markerii serologici analizați (MMP-3, MMP-9 și IL-13) pot fi considerați ca o alternativă diagnostică sau suplimentară la CRP, VSH și alți indici inflamatori de boală, în diagnosticul bolilor inflamatorii intestinale, cât și în scop prognostic pentru predicția evoluției bolii și în orientarea terapeutică.

Cuvinte cheie : ELISA, metaloproteinaze matriceale, interleukine, curba ROC, acuratețe diagnostică.

I. STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul I - “Epidemiologia bolilor inflamatorii intestinale” prezintă date recente referitoare la incidența și prevalența acestor entități, cum influențează vârsta, sexul, diferențele rasiale/etnice acești parametri epidemiologici și evoluția BII, în lume și România. Au fost observate variații geografice ale BII și s-au constatat un gradient nord-sud și vest-est al incidenței și prevalenței acestor afecțiuni la nivel mondial.

Capitolul II - “Etiopatogeneza bolilor inflamatorii intestinale” trece în revistă principalele mecanisme etiopatogenice implicate în BII, fiind considerate boli multifactoriale.

Cauzele exacte și mecanismele etiopatogenice care duc la distrugerile tisulare sunt extrem de complexe și incomplet cunoscute până în prezent. În ultimul deceniu s-a intensificat cercetarea științifică a acestor afecțiuni, s-au formulat mai multe

teorii/ipoteze care să explice mecanismele etiopatogenezei și au apărut suficiente progrese pentru a accepta următoarea *ipoteză* ca fiind valabilă : BII constituie un răspuns imun inadecvat care apare la indivizii susceptibili genetic, ca rezultat al unei interacțiuni complexe între evoluția schimbărilor de mediu induse de progresul societății, microflora intestinală diferită în mod constant și hiperactivarea sistemului imun intestinal individual. Toate acestea au ca finalitate pierderea homeostaziei și a funcției de barieră a mucoasei intestinale, afectarea tisulară mediată imun și apariția manifestărilor clinice. Datele experimentale și observațiile clinice, obținute prin studierea mecanismelor imune alterate și a inflamației intestinale pe modele animale, la care s-a indus și generat un model de boală, au contribuit la înțelegerea patogenezei BII. Aceste mecanisme imune alterate au la bază defecte înnăscute sau dobândite ale sistemului imun, având ca trigger declanșator microflora intestinală.

Capitolul III - “Susceptibilitatea genetică în bolile inflamatorii intestinale” prezintă date privind rolul factorilor genetici și principalele gene de susceptibilitate implicate în patogeneza BII.

În paralel cu cercetările din domeniul imunologiei, o contribuție importantă în studierea patogenezei BII a avut și domeniul geneticii moleculare. Studiile epidemiologice și de migrație a populației au evidențiat diferențe semnificative ale incidenței și prevalenței BII în ceea ce privește distribuția geografică și etnică. Aceste observații au condus la formularea de noi ipoteze, așa cum ar fi rolul posibil al *factorilor genetici* în patogeneza BII. Pentru a dovedi această ipoteză s-au realizat inițial studii privind agregarea familială, urmate de studiile pe gemenii monoziгоți și dizigoți. Au urmat, începând cu anii 2000 studiile de linkage genetic pe cohorte de pacienți înrudiți ce au condus la identificarea locusului *IBD1* de pe cromozomul 16 și la descoperirea primei gene de susceptibilitate pentru BC, *gena NOD2/CARD15*. Dar cele mai importante progrese în domeniul geneticii moleculare au fost trecerea de la analiza genelor candidate la studii de asociere la nivelul întregului genom, *GWAS*, ce au permis

identificarea a mii de polimorfisme în genomul uman și peste 160 de noi gene de susceptibilitate pentru BII.

Începând cu anul 1996 studiile de linkage genetic, de scanare a genomului uman, utilizând ca markeri microsateliți ADN, au contribuit la identificarea mai multor regiuni de susceptibilitate pentru BC situate pe mai mulți cromozomi 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 și X . Ulterior, regiuni/locusuri de pe cromozomii 16, 12, 6, 14, 5, 19 și 1 au fost redenumite începând cu IBD1 până la IBD7 și numai locusurile IBD1, IBD2, IBD3 și IBD4 au fost replicate în studii (Tabelul 1).

Regiunea	Localizare	Gene implicate
IBD 1	Cromozomul 16	NOD2/CARD15 , IL-4R, CD11B
IBD 2	Cromozomul 12	Receptorul vit. D, STAT 6, Interferon γ
IBD 3	Cromozomul 6	Complexul major de histocompatibilitate (MHC)
IBD 4	Cromozomul 14	Receptorul Ly T (TCR)
IBD 5	Cromozomul 5	OCTN , DLG5 , MDR1 , IL-6, CD14
IBD 6	Cromozomul 19	Tromboxan A2, Leucotriena B4, ICAM-1
IBD 7	Cromozomul 1	TGF β , Receptorii TNF α
IBD 8	Cromozomul 16	-
IBD 9	Cromozomul 9	Receptorii pentru chemokine (CCR-5, CCR-9), IL-12

Tabelul 1 . Regiunile și genele importante implicate în BII

(Adaptat după Zheng CQ) [1].

În **Capitolul IV** intitulat “**Markerii serologici în bolile inflamatorii intestinale**” sunt prezentați cei mai importanți markeri serologici studiați în bolile inflamatorii intestinale și corelațiile lor cu anumite fenotipuri de boală.

MMP sunt o familie de endopeptidaze Zn^{2+} și Ca dependente, considerate a fi cele mai puternice proteaze ce controlează homeostazia proteinelor matricei extracelulare, inclusiv reglarea funcției celulare, creșterea, diviziunea celulară, reglarea apărării înnăscute și dobândite a gazdei, cât și controlul sintezei matricei extracelulare.

În ultimii ani multe studii au avut ca obiectiv înțelegerea implicării MMP în homeostazia intestinală, dar și rolul și funcția lor în BII. Mai multe metaloproteinaze matriceale (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12, MT-MMP-1) au fost raportate a fi implicate în patogeneza colitelor induse la o mare varietate de modele animale. De asemenea, studiile au arătat că nivelurile crescute ale MMP se corelează direct proporțional cu activitatea bolii. Dintre MMP, MMP-3 și MMP-9 au avut o exprimare predominantă în majoritatea studiilor efectuate pe colitele induse, la animalele de laborator, cu sulfat de sodiu dextran, acid trinitrobenzensulfonic și *Salmonella typhimurium*. MMP-3 și MMP-9 au fost asociate cu leziuni la nivelul mucoasei colonului și cu apariția complicațiilor, fistule, la pacienții cu BC.

Capitolul V - “Clasificarea fenotipică a bolilor inflamatorii intestinale” prezintă clasificarea fenotipică Montreal a celor două entități clinico-patologice de BII.

II. CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul VI - SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Obiectivul tezei îl constituie analiza complexă din punct de vedere epidemiologic, fenotipic și serologic a pacienților cu BII (BC și CU), în Centrul de referință Craiova, județul Dolj. Proiectul de cercetare științifică se axează pe următoarele obiective specifice :

- Analiza principalilor *parametri epidemiologici* (incidența, prevalența) în BII și a tendințelor de modificare a acestora în județul Dolj ;
- Evaluarea *caracteristicilor fenotipice* ale pacienților cu BII în ceea ce privește vârsta de debut, localizarea, severitatea leziunilor inflamatorii și complicațiile intestinale și extra-intestinale ;
- Determinarea *profilului serologic* al pacienților cu identificarea de asocieri între dinamica concentrațiilor serice ale acestor markeri serologici și diferitele fenotipuri clinice de boală și stabilirea de corelații între markerii serologici și severitatea puseului de activitate al BII prin :
 - cuantificarea *MMP-3* (Stromelizina 1), *MMP-9* (Gelatinaza B), cu rol în distrucția tisulară și a componentei matricei extracelulare ;
 - măsurarea nivelurilor unor citokine (citokina pro-inflamatoare *IL-17* și a citokinei anti-inflamatoare *IL-13*), cu rol în inițierea mecanismelor imuno-patogenice ;
 - măsurarea *CRP*, prin determinare înalt specifică (*hs-CRP*), marker important în cuantificarea răspunsului inflamator.
- Evaluarea acurateții diagnostice a determinării metaloproteinazelor matriceale și a interleukinelor comparativ cu determinarea CRP, folosind analiza prin *curba ROC*.

Capitolul VII – MATERIAL ȘI METODĂ

VII.1. Stabilirea loturilor și includerea pacienților în studiu

În acest studiu au fost incluși 67 de pacienți diagnosticați cu BC și CU, pe baza istoricului, examenului clinic, a endoscopiei digestive inferioare și a examenului anatomopatologic al pieselor de biopsie. Pacienții cuprinși în acest studiu au fost diagnosticați în Clinica Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, în intervalul octombrie 2011- mai 2014.

Pentru analiza comparată a fost constituit un lot control (pacienți fără BII active sau în antecedente) format din 30 de subiecți sănătoși selecționați din pacienții investigați pentru alte afecțiuni digestive, tot în Clinica de Gastroenterologie. Ambele loturi au fost stabilite pe baza unor criterii de includere și excludere. Atât pacienții cu BII cât și subiecții control au semnat un consimțământ informat de includere în studiu. Pentru fiecare pacient cu BII s-a întocmit un *formular structurat* care a cuprins informații de contact, date demografice, antecedente heredo-colaterale și personale patologice, manifestări clinice, analize de laborator, clasificarea fenotipică Montreal, complicații intestinale și extraintestinale, clasele de medicamente utilizate și schema de tratament actuală.

VII.2. Recoltarea probelor și materialul biologic

La pacienții din ambele loturi (lotul cu BII și lotul control) materialul biologic a fost reprezentat de sânge (aproximativ 5 ml de sânge venos) recoltat în eprubete fără coagulant. După recoltare, a urmat separarea cheagului prin centrifugare (15 min la 1500 rpm) în cel mult 4 ore de la recoltare, după procedura standard. Tuburile cu ser au fost închise etanș, pentru a evita contaminarea și depozitate la temperaturi între +2°C și +8°C timp de 3 zile dacă probele s-au lucrat imediat sau au fost congelate la cel puțin -20°C și chiar -80°C dacă probele s-au lucrat la un interval de timp mai mare. Probele au fost codificate cu litere și numere acordate în ordinea recoltării.

VII.3. Determinarea prezenței și a concentrațiilor markerilor serologici

Determinarea *profilului serologic* al pacienților cu BII, precum și identificarea de asocieri între dinamica concentrațiilor serice ale markerilor serologici și diferitele fenotipuri clinice de boală și stabilirea de corelații între markerii serologici și severitatea puseului de activitate al BII, s-au realizat în *Laboratorul de Imunologie* din cadrul UMF din Craiova. Pentru dozarea cantitativă a IL-17, IL-13, MMP-3, MMP-9, CRP am utilizat tehnica *ELISA*.

VII.4. Analiza statistică

Informațiile obținute au fost stocate în fișiere Microsoft Excel, fiind apoi prelucrate statistic, în vederea analizării relațiilor dintre datele clinice și paraclinice ale pacienților. Sistemul de management a datelor pacienților precum și prelucrarea acestor date s-a efectuat folosind programul Microsoft Excel, împreună cu suita *XLSTAT* pentru MS Excel, iar analiza statistică a fost făcută cu ajutorul softurilor dedicate calculelor statistice științifice, *GraphPad Prism 5* și *IBM SPSS Statistics 20.0*. Am folosit *analiza prin curba ROC* pentru a detecta posibile valori prag, cut-off, pe care să le folosim în practică pentru a face separarea pacienților cu afecțiuni inflamatorii intestinale de pacienții fără o astfel de patologie.

Capitolul VIII – ASPECTE EPIDEMIOLOGICE ÎN BII

Cerectarea noastră reprezintă primul studiu epidemiologic efectuat în centrul nostru de referință și furnizează primele date epidemiologice, caracteristice pacienților diagnosticați cu BII :

1. Datele sunt în concordanță cu observațiile anterioare furnizate de studiile efectuate în Centrul de referință București și confirmă incidența anuală medie redusă a BC și a CU în județul Dolj ($0.82/10^5$ locuitori, respectiv $1.26/10^5$) (Figura 1) [2,3].
2. Am constatat o incidență mai mare a CU comparativ cu BC.

3. BC a debutat la o vârstă mai tânără (vârsta medie de 39.52 ani) comparativ cu cea din populația vestică sau central Europeană, având o distribuție echilibrată cu o ușoară preponderență a sexului feminin și cu un singur vârf de incidență [4-10].
4. CU a avut o vârstă de debut (vârsta medie de 44.80 ani) similară cu cea din populația vestică [4-10], cu o distribuție bimodală (intervalele 20-29 ani și 50-59 ani) a incidenței la femei și repartiție egală pe sexe.
5. Incidența BC este nesemnificativ mai mare în mediul rural comparativ cu mediul urban. În mediul urban se constată incidența crescută a CU, semnificativă statistic ($p=0.013$), față de mediul rural.

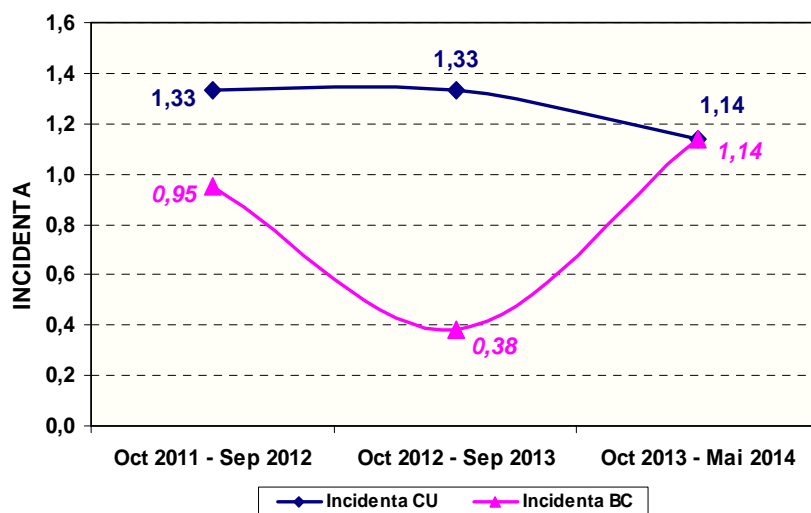


Figura 1. Evoluția incidenței anuale a CU și BC

Capitolul IX. PARTICULARITĂȚI FENOTIPICE ALE PACIENȚILOR ÎN BOLILE INFLAMATORII INTESTINALE

Pentru analiza particularităților fenotipice ale pacienților diagnosticați cu BII, am studiat două loturi de pacienți :

- **Lotul 1** - reprezentat de **21 pacienți** adulți cu **BC** (toți pacienții cunoscuți sau nou-diagnosticați), internați și investigați în Clinica Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova în perioada analizată octombrie 2011 – mai 2014. Datele au fost preluate și analizate din documentele medicale existente, aflate în arhiva Clinicii. Fiecare pacient a fost încadrat conform *clasificării Montreal* în funcție de : vârsta la diagnostic (A1: < 16 ani, A2: 17- 40 ani, A3: > 40 ani), localizarea leziunilor (L1: ileală, L2: colonică, L3: ileo-colonică, L4: tub digestiv superior, p: perianală) și patternul (tipul) leziunilor (B1: non-stenozant, non-penetrant, B2: stenozant, B3: penetrant). Pentru fiecare caz a fost calculat **scorul Harvey-Bradshaw (HBI)**, util în evaluarea pacienților în funcție de severitatea puseului de activitate a bolii. În funcție de scorul obținut fiecare pacient a fost încadrat în tipul de activitate corespunzător, astfel: scor HBI = 5-7, activitate ușoară; scor HBI = 8-16, activitate moderată ; scor HBI = > 16, activitate severă [11].
- **Lotul 2** - reprezentat de **46 pacienți** adulți cu **CU** (toți pacienții cunoscuți sau nou-diagnosticați), internați și investigați de asemenea în Clinica Gastroenterologie, în aceeași perioadă analizată, octombrie 2011 – mai 2014. Și pentru acest lot s-a procedat la fel, fiecare caz a fost încadrat conform clasificării Montreal în funcție de extensia leziunilor : E1 - proctită, E2 - colită stângă, E3 - colită extinsă. Pentru clasificarea cazurilor în funcție de severitatea bolii am utilizat **scala TRUELOVE-WITTS (TWI)**. În funcție de scorul obținut fiecare pacient a fost încadrat în tipul de activitate corespunzător, astfel : scor TWI = < 5, activitate ușoară ; scor TWI = 5-9, activitate moderată ; scor TWI = > 9, activitate severă [12].

➤ Rezultate

1. În județul Dolj, la nivelul centrului nostru, observăm că vârsta de debut pentru cele două entități clinico-patologice este cu 5 ani mai mare comparativ cu vârsta țărilor Central și Vest Europene. Se constată o tendință de apariție a CU la vârste mai tinere în ultimii ani [4, 5, 14, 15].
2. Peste jumătate din cazurile nou-diagnosticate cu BC au prezentat afectarea colonică. Colita stângă a predominat la pacienții cu CU. Observăm o progresie fenotipică a bolii în timp, la pacienții nou-diagnosticați cu colită scade ponderea colitei stângi, se dublează ponderea colitelor extinse și se înregistrează cazuri de proctită (Figurile 2, 3 și 4).

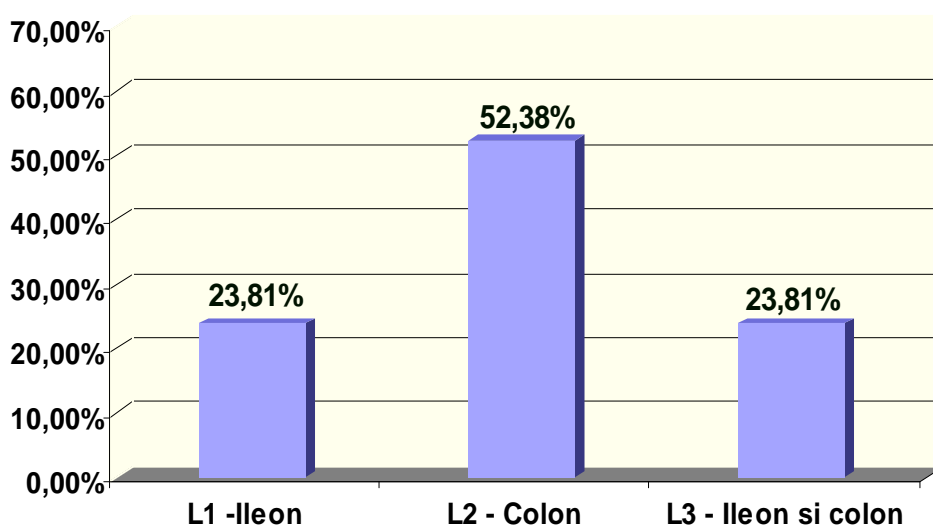


Figura 2. BC – Clasificarea Montreal L – clasificarea pacienților în funcție de localizarea leziunilor

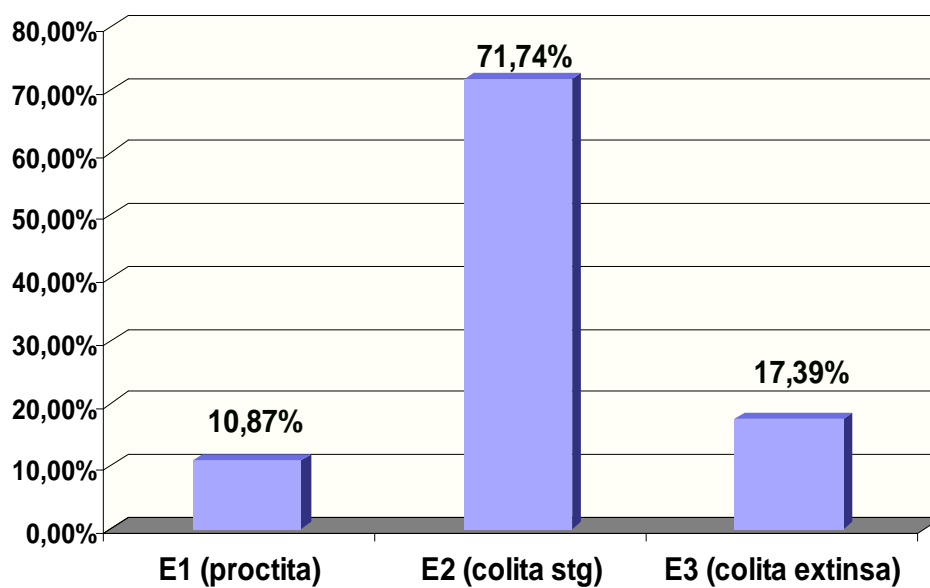


Figura 3. CU – Distribuția cazurilor în funcție de localizarea leziunilor

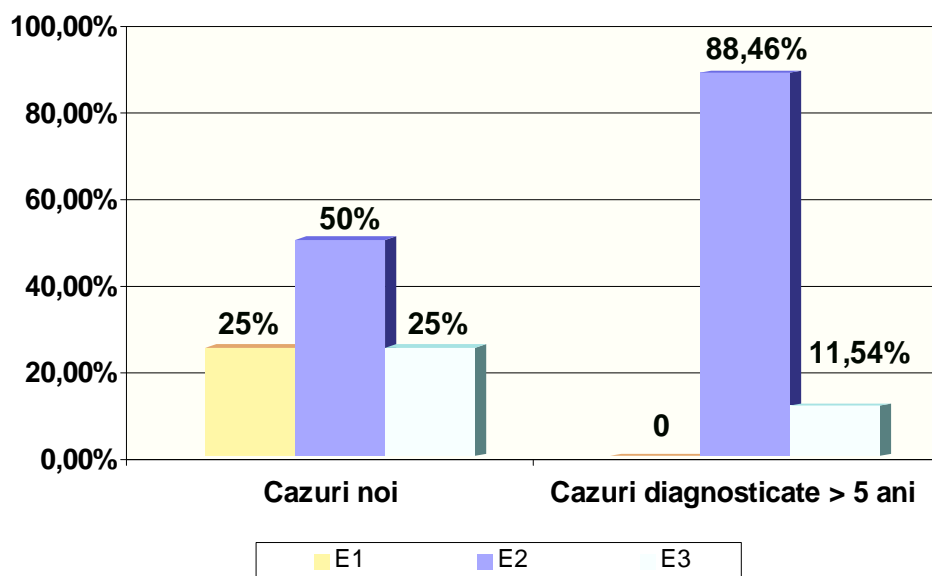


Figura 4. CU – Localizarea leziunilor la pacienții cu diagnostic mai vechi de 5 ani vs cazuri nou-diagnosticate

(E1: proctită, E2: colită stângă, E3: colită extinsă, $p=0.0067$)

3. Fenotipului non-stenozant, non-penetrant (forma inflamatorie) este cel mai frecvent întâlnit în BC (Figura 5).

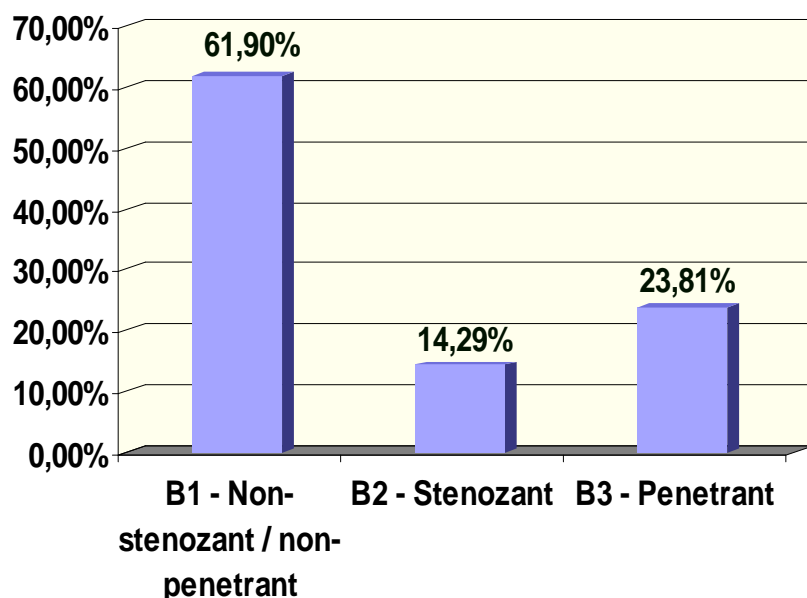


Figura 5. BC – Clasificarea Montreal B – clasificarea pacienților în funcție de patternul leziunilor

4. Formele ușoare și moderate au predominat în ambele entități.
5. Absența manifestărilor perianale, frecvența scăzută a complicațiilor intestinale și a celor extra-intestinale în lotul nostru, sugerează o evoluție blândă a BC și a CU în centrul nostru (județul Dolj). Datele sunt mici în comparație cu cele comunicate în literatura Vest Europeană.

Capitolul X. ASPECTE SEROLOGICE ÎN BII

Dozarea cantitativă a IL-17, IL-13, MMP-3, MMP-9, CRP s-a realizat utilizând kituri ELISA, furnizate de INVITROGEN Corporation (Camarillo, CA, USA), urmărind protocolul de lucru, conform recomandărilor producătorului. Valorile au fost exprimate în pg/mL (IL-13, IL-17, MMP-9), ng/mL (MMP-3) și mg/mL (CRP). Pentru identificarea de asocieri între concentrațiile acestor markeri serologici și diferitele fenotipuri clinice de boală, atât pentru BC cât și pentru CU, am utilizat datele furnizate de clasificarea Montreal.

Pentru *analiza statistică a rezultatelor* am verificat distribuția gaussiană a valorilor din seriile obținute cu ajutorul testelor de normalitate *Kolmogorov-Smirnov* sau *D'Agostino & Pearson*. Astfel concentrațiile serice ale MMP-3 au avut o distribuție normală după log-transformare (din considerente statistice și de aspect, prin logaritmare se reduce plaja valorilor, păstrând raporturile inițiale), în timp ce concentrațiile celorlalți markeri serologici, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP, la analiza cu testul de normalitate D'Agostino & Pearson au avut o distribuție gaussiană. Toate valorile au fost exprimate prin media aritmetică (*mean*), însoțită de intervalul de încredere de 95% (*95% CI*).

➤ Rezultate

❖ **Asocieri între dinamica concentrațiilor serice și diferite profiluri fenotipice în BII**

1. Studiul realizat în Centrul nostru a subliniat asocierea anumitor caracteristici fenotipice cu markerii serologici analizați, la pacienții cu BII.
2. Pentru prima dată am demonstrat prezența concentrațiilor semnificativ mai mari ale MMP-3, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP în serul pacienților cu BII, comparativ cu lotul control.

3. Concentrații semnificativ mai mari ale MMP-3 s-au observat la pacienții cu debut peste 40 ani (A3) a BC, la cei cu afectare colonică (L2), cu pattern non-stenozant, non-penetrant (B1) și penetrant/fistulizant (B3) și la pacienții cu extensie la nivelul colonului stâng (E2) a CU.
4. Nivelurile serice ale MMP-9 s-au asociat cu debutul precoce al BC (sub 40 ani), la cei cu afectare ileală (L1), cu pattern stenozant (B2) și la pacienții cu localizare stângă a colitei (E2).
5. Citokina anti-inflamatoare IL-13 a prezentat valori serice semnificativ mai mari la pacienții cu debut peste 40 ani, cu afectare ileală și la pacienții cu colită stângă.
6. Citokina pro-inflamatoare IL-17 s-a asociat cu debut sub 40 ani a BC, cu localizarea colonică și ileo-colonică și cu proctitele.
7. Singurele concentrații serice semnificativ mai mari ale CRP au fost asociate colitei extinse.

❖ **Asocieri între dinamica concentrațiilor serice și activitatea clinică în BII**

Analiza complexă a celor două loturi incluse în studiu (lotul 1, pacienți diagnosticați cu BC, respectiv lotul 2, pacienții cu CU) a cuprins și investigarea existenței diferitelor asocieri între concentrațiile markerilor serologici și severitatea puseelor de activitate clinică, pentru fiecare entitate clinică. Severitatea puseului de activitate clinică a fost estimată abordând două scale/scoreuri (HBI respectiv TWI) utilizate în practica medicală curentă, pentru evaluarea pacienților, dar și pentru monitorizarea evoluției și aprecierea eficienței schemelor terapeutice. În funcție de scorul obținut fiecare pacient a fost încadrat în tipul de activitate corespunzător

Distribuția pacienților în funcție de entitatea clinico-patologică și severitatea puseului de activitate clinică, în funcție de scorul obținut, este prezentată în Tabelele 2 și 3.

Lotul 1 – Pacienți diagnosticați cu BC

	<i>Activitate</i>	HBI	<i>Nr. pacienți</i>	%
<i>Scorul Harvey-Bradshaw</i>	Activitate ușoară	6.00 (5.24-6.75)	7	33.33
<i>(Severitatea puseului de activitate)</i>	Activitate moderată	12.56 (10.67-14.44)	9	42.86
	Activitate severă	18 (16.76-19.24)	5	23.81

Tabelul 2. Distribuția pacienților cu BC în funcție de severitatea puseului de activitate

Lotul 2 – Pacienți diagnosticați cu CU

	<i>Activitate</i>	TWI	<i>Nr. pacienți</i>	%
<i>Scala Truelove-Witts</i>	Activitate ușoară	3.20 (2.89-3.51)	15	32.61
<i>(Severitatea puseului de activitate)</i>	Activitate moderată	7.23 (6.72-7.74)	22	47.83
	Activitate severă	11.33 (10.18-12.49)	9	19.56

Tabelul 3. Distribuția pacienților cu CU în funcție de severitatea puseului de activitate

Comparând concentrațiile markerilor analizați, am constatat că valorile lor serice în subgrupurile de pacienți cu activitate ușoară, moderată și severă au fost semnificativ mai mari, comparativ cu lotul control ($p < 0.0001$). Concentrațiile serice ale MMP-3, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP pentru BC respectiv CU sunt evidențiate în Tabelele 4 și 5.

Parametru (mean ± SD)	Activitate severă	Activitate moderată	Activitate ușoară	Lot control
MMP-3 (ng/ml)	9.69 ± 1.40	9.88 ± 1.60	7.00 ± 2,27	3.23 ± 0.86
MMP-9 (pg/ml)	544,42 ± 189,30	531.90 ± 109,80	505,60 ± 67,91	112.20 ± 21.10
IL-13 (pg/ml)	65,78 ± 21,54	82,11 ± 19,42	64,83 ± 25,52	26.16 ± 4.64
IL-17 (pg/ml)	53,99 ± 4,54	58,55 ± 34,42	45,74 ± 7,61	34.08 ± 10.33
hs-CRP (mg/ml)	13,00 ± 4,80	9,00 ± 4,87	7,14 ± 2,12	5.17 ± 3.48

Tabelul 4. Concentrațiile markerilor serologici în funcție de diferite stadii de activitate clinică a BC

Parametru (mean ± SD)	Activitate severă	Activitate moderată	Activitate ușoară	Lot control
MMP-3 (ng/ml)	7.08 ± 3.76	5.89 ± 3.34	3.60 ± 1,17	3.23 ± 0.83
MMP-9 (pg/ml)	683.50 ± 93.61	646.13 ± 101.20	519.19 ± 17.39	112.20 ± 21.10
IL-13 (pg/ml)	61.81 ± 22.48	64.62 ± 31.15	57.40 ± 33.29	26.16 ± 4.64
IL-17 (pg/ml)	42.32 ± 5.32	47.76 ± 10.83	34.48 ± 15.42	34.08 ± 10.33
hs-CRP (mg/ml)	16,11 ± 10.06	10.86 ± 6.47	7.17 ± 5.20	5.17 ± 3.48

Tabelul 5. Concentrațiile markerilor serologici în funcție de diferite stadii de activitate clinică a CU

În studiul nostru, am identificat și asocieri semnificative ale MMP-3, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP cu diferite stadii de activitate clinică a BC și CU.

❖ **BOALA CROHN** - am observat că **MMP-3** a avut o creștere până la stadiul moderat de activitate, cu o scădere ulterioară în stadiul sever. Diferențe semnificative statistic au fost între concentrațiile MMP-3 din serul pacienților cu activitate severă și activitate moderată vs activitate ușoară (Figura 6).

Spre deosebire de MMP-3, în cazul **MMP-9** concentrațiile serice au crescut direct proporțional cu activitatea BC, cele mai mari concentrații având pacienții cu activitate severă de boală. Singura diferență care a atins semnificație statistică s-a observat între concentrațiile MMP-9 din serul pacienților cu activitate severă vs activitate ușoară (Figura 7).

Datele obținute de noi sunt în concordanță cu observațiile din literatura de specialitate, prezentate anterior [16-20].

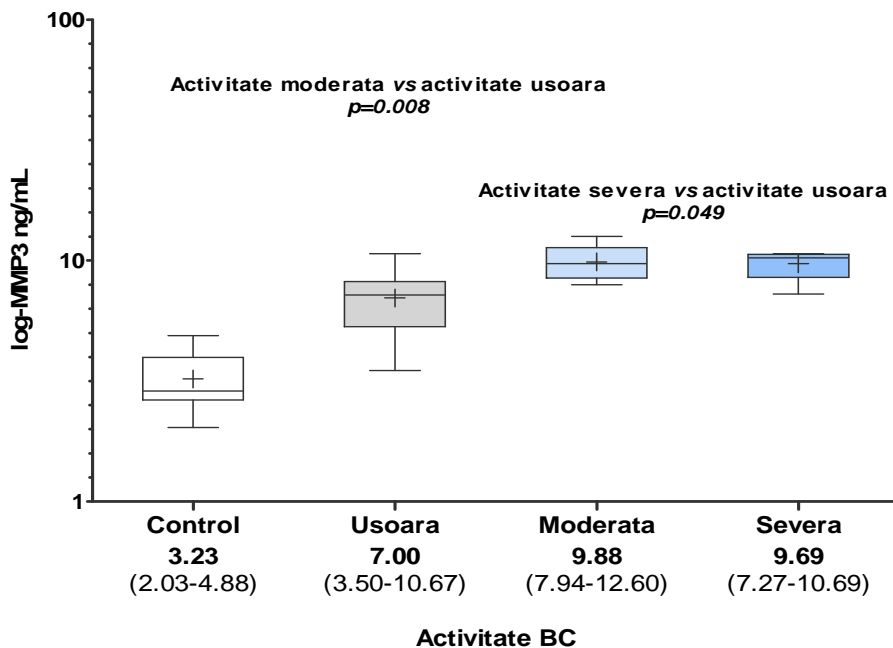


Figura 6. Concentrațiile MMP-3 în serul pacienților aflați în diferite stadii de activitate clinică a BC vs lotul control

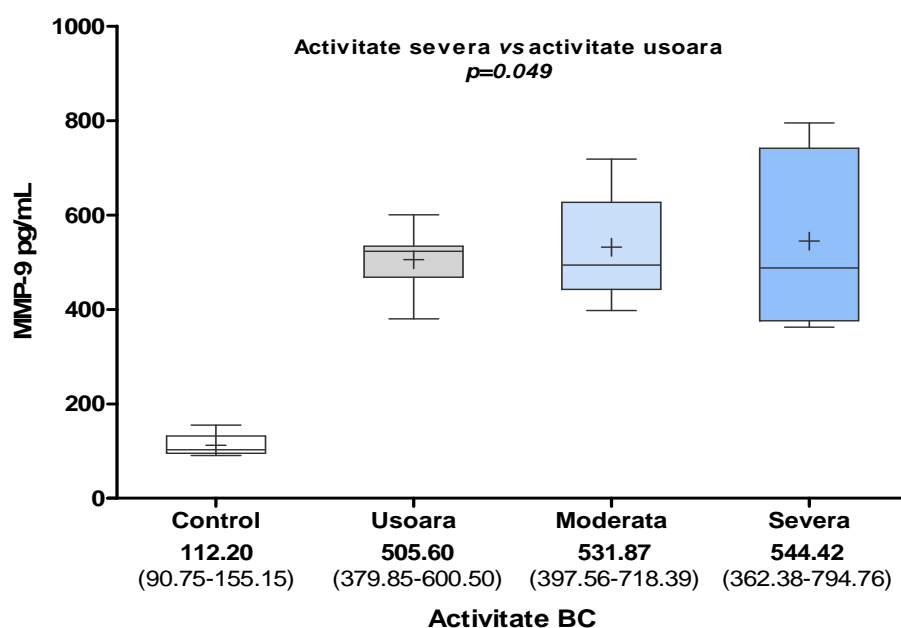


Figura 7. Concentrațiile MMP-9 în serul pacienților aflați în diferite stadii de activitate clinică a BC vs lotul control

Pentru cele două citokine, IL-13 și IL-17, am observat concentrații în creștere, cu un maxim în grupul pacienților cu activitate moderată a BC, urmând o ușoară scădere în grupul pacienților cu activitate severă. Semnificație statistică au atins nivelurile din grupurile cu activitate moderată vs activitate severă și activitate moderată vs activitate ușoară (pentru IL-13) și între concentrațiile din serul pacienților cu activitate severă și activitate moderată vs activitate ușoară (în cazul IL-17). Pentru cele două citokine nu am găsit date în literatura de specialitate la care să ne raportăm.

CRP a prezentat niveluri serice ce au crescut împreună cu activitatea bolii, diferențe semnificative statistic fiind doar între grupul pacienților cu activitate severă vs activitate ușoară.

❖ **COLITA ULCERATIVĂ** - ambele proteinaze, MMP-3 și MMP-9, au prezentat concentrații serice care au crescut direct proporțional cu activitatea bolii, cele mai mari concentrații având pacienții cu activitate severă de boală. Atât MMP-3 cât și MMP-9 au prezentat diferențe semnificative statistic între concentrațiile din serul pacienților cu activitate severă și activitate moderată *vs* activitate ușoară. Datele obținute în studiul nostru sunt în concordanță cu datele recent publicate în literatura de specialitate [16-20].

Concentrațiile IL-13 și IL-17 în serul pacienților cu CU, au prezentat un trend asemănător celor din lotul cu BC, cu un maxim în grupul pacienților cu activitate moderată, urmând o ușoară scădere în grupul pacienților cu activitate severă. Semnificație statistică s-a atins doar în cazul IL-17, între nivelurile din serul pacienților cu activitate severă și activitate moderată *vs* activitate ușoară (Figurile 8, 9).

CRP a înregistrat în serul pacienților cu CU o creștere direct proporțională cu severitatea puseului de activitate, niveluri maxime având pacienții din grupul cu activitate severă. CRP s-a asociat cu niveluri semnificative la pacienții din grupurile cu activitate severă și moderată *vs* activitate ușoară. Datele sunt în concordanță cu observațiile anterioare din literatura de specialitate [369].

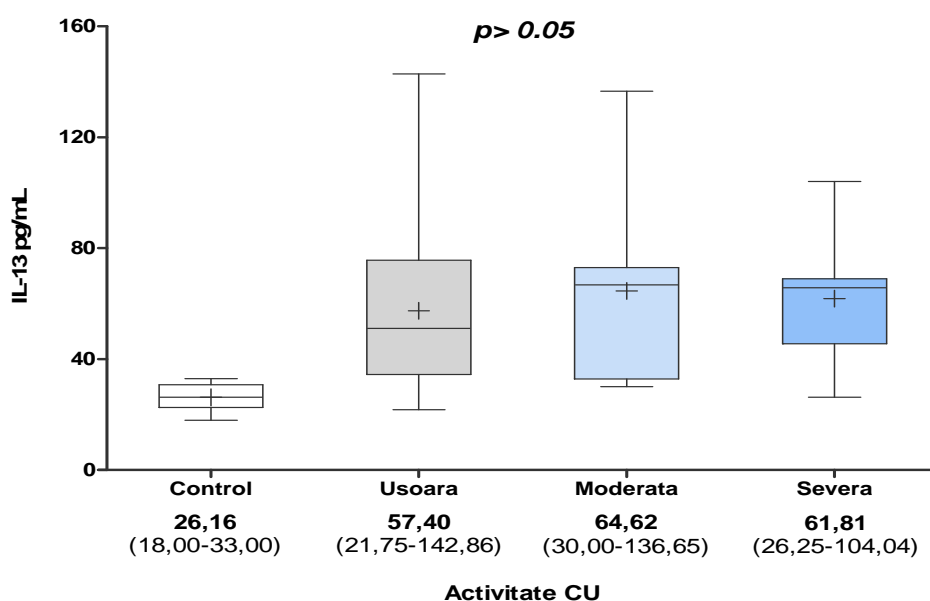


Figura 8. Concentrațiile IL-13 în serul pacienților aflați în diferite stadii de activitate clinică a CU vs lotul control

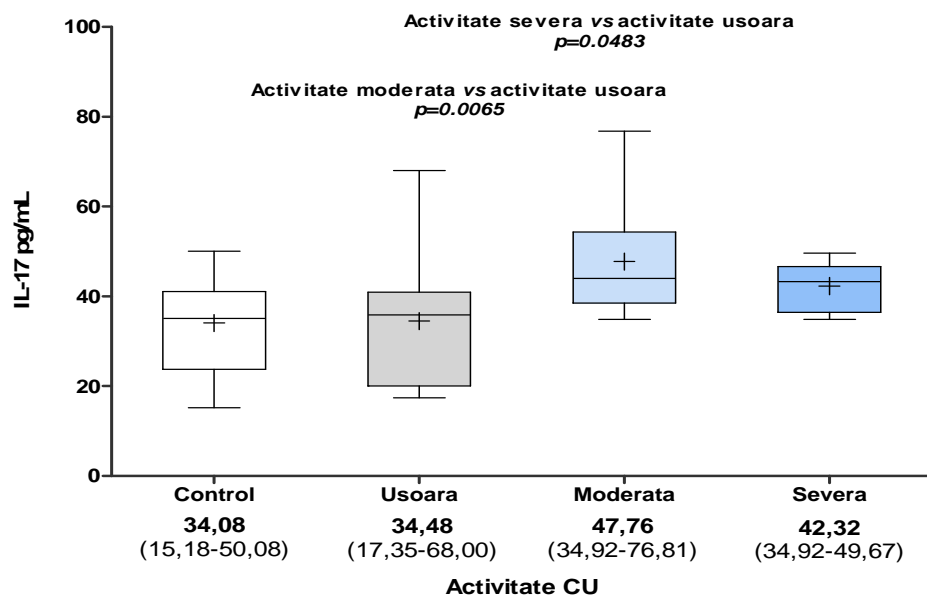


Figura 9. Concentrațiile IL-17 în serul pacienților aflați în diferite stadii de activitate clinică a CU vs lotul control

❖ Corelații în BII

Studiul profilului serologic al pacienților diagnosticați cu bolile inflamatorii intestinale, a continuat cu un alt obiectiv specific, acela de a stabili *corelații* între markerii serologici investigați (MMP, IL și CRP) și între markerii serologici și scorurile HBI respectiv TWI de evaluare a severității puseului de activitate a bolii.

- Folosind softul *GraphPad Prism 5* am calculat *coeficientul de corelație Pearson* și am demonstrat prezența de corelații între concentrațiile serice ale MMP-3, MMP-9 cu activitatea BII la adulți (scorurile HBI, respectiv TWI) și cu ceilalți indici evaluați pentru cuantificarea răspunsului inflamator al organismului în BC (Tabelul 6), respectiv CU (Tabelul 7).

Markeri	MMP-3	MMP-9	HBI	IL-13	IL-17	CRP
MMP-3		$r = 0.554^*$ $p = 0.037$	$r = 0.276^*$ $p = 0.049$	$r = -0.341^*$ $p = 0.030$	$r = 0.216^*$ $p = 0.047$	$r = 0.016$ $p = 0.943$
MMP-9			$r = 0.608^*$ $p = 0.039$	$r = -0.349^*$ $p = 0.029$	$r = -0.037$ $p = 0.874$	$r = 0.246$ $p = 0.282$
HBI				$r = 0.063$ $p = 0.785$	$r = 0.300^*$ $p = 0.046$	$r = 0.398^*$ $p = 0.047$
IL-13					$r = 0.365$ $p = 0.103$	$r = -0.061$ $p = 0.791$
IL-17						$r = -0.226$ $p = 0.322$

r coeficientul de corelație Pearson, * Corelație semnificativă statistic

Tabelul 6. Corelații între markerii serologici evaluați în BC

Markeri	MMP-3	MMP-9	IL-13	IL-17	CRP	TWI
MMP-3	$r = 0.248$ $p = 0.095$	$r = 0.036$ $p = 0.810$	$r = 0.213$ $p = 0.154$	$r = 0.209$ $p = 0.162$	$r = 0.344^*$ $p = 0.029$	
MMP-9		$r = 0.259^*$ $p = 0.048$	$r = 0.563^*$ $p = 0.00004$	$r = 0.425^*$ $p = 0.003$	$r = 0.308^*$ $p = 0.037$	
IL-13			$r = 0.354^*$ $p = 0.015$	$r = 0.108$ $p = 0.473$	$r = 0.093$ $p = 0.538$	
IL-17				$r = 0.588^*$ $p = 0.00001$	$r = 0.312$ $p = 0.034$	
CRP					$r = 0.223$ $p = 0.136$	

r coeficientul de corelație Pearson, * Corelație semnificativă statistic

Tabelul 7. Corelații între markerii serologici evaluați în CU

- În lotul pacienților cu boală Crohn, dintre proteinaze, concentrațiile serice ale **MMP-3** s-au corelat mult mai bine cu indicii de boală evaluați pentru această entitate. De asemenea dintre citokine doar **IL-17** a prezentat corelație cu scorul de boală HBI.
- În lotul pacienților cu colită ulcerativă, **MMP-9** a prezentat niveluri serice corelate mult mai bine cu indicii evaluați. Dintre citokine, pentru **IL-17** am identificat concentrații mai bine corelate cu indicii de boală.
- Toate datele obținute în studiul nostru atât pentru lotul de pacienți cu boala Crohn, cât și pentru lotul pacienților cu colită ulcerativă sunt în concordanță cu observațiile anterioare din literatura de specialitate.

❖ **Acuratețea diagnostică a markerilor serologici**

Un ultim obiectiv al studiului nostru a fost de a determina performanța/acuratețea diagnostică a markerilor serologici analizați comparativ cu CRP, utilizând analiza prin curba ROC. Am folosit *analiza prin curba ROC* pentru a detecta posibile valori prag (cut-off), pe care să le folosim în practică pentru a face separarea pacienților cu BC și CU, de subiecții fără o astfel de patologie. Pentru diversele valori prag investigate la fiecare marker, am calculat sensibilitatea (Sn), specificitatea (Sp), precum și valorile predictiv pozitivă (VPP) și negativă (VPN) și likelihood ratio pozitivă (LR+) sau rata fals pozitivă și likelihood ratio negativă (LR-) sau rata fals negativă. Performanța a fost exprimată ca aria de sub curba ROC (*AUC*, area under ROC curve), însoțită de intervalul de încredere de 95% (*95% CI*) și *p* statistic pentru diferența dintre *AUC* calculat și *AUC*= 0.05 (marcator fără putere discriminativă).

- Comparând curbele ROC pentru cei 5 parametri analizați (Tabelul 8), se observă că separarea cea mai bună a bolnavilor cu BC se poate face cu ajutorul MMP, cea mai performantă detecție făcându-se cu ajutorul *MMP-9* (*acuratețe de 100%*), urmată de interleukine, *IL-13* (*acuratețe de 97.90%*) având performanțe mai bune decât *IL-17*, dar mai slabe decât MMP, cea mai puțin bună detecție făcându-se prin dozarea *CRP* (și aceasta făcând o separare bună a cazurilor) (Figura 10).

<i>Parametru</i>	<i>AUC</i>	<i>Prag propus (cut-off)</i>	<i>Valoarea p AUC<>50%</i>	<i>Sensibilitate</i>	<i>Specificitate</i>
MMP-9	1.000	155.15	< 0.0001	100.00%	100.00%
MMP-3	0.992	4.88	< 0.0001	95.24%	100.00%
IL-13	0.979	32.95	< 0.0001	95.24%	93.33%
IL-17	0.885	42.35	< 0.0001	85.71%	80.00%
<i>CRP</i>	<i>0.819</i>	<i>6.00</i>	<i>< 0.0001</i>	<i>80.95%</i>	<i>76.67%</i>

Tabelul 8. BC – Performanța diagnostică a markerilor serologici

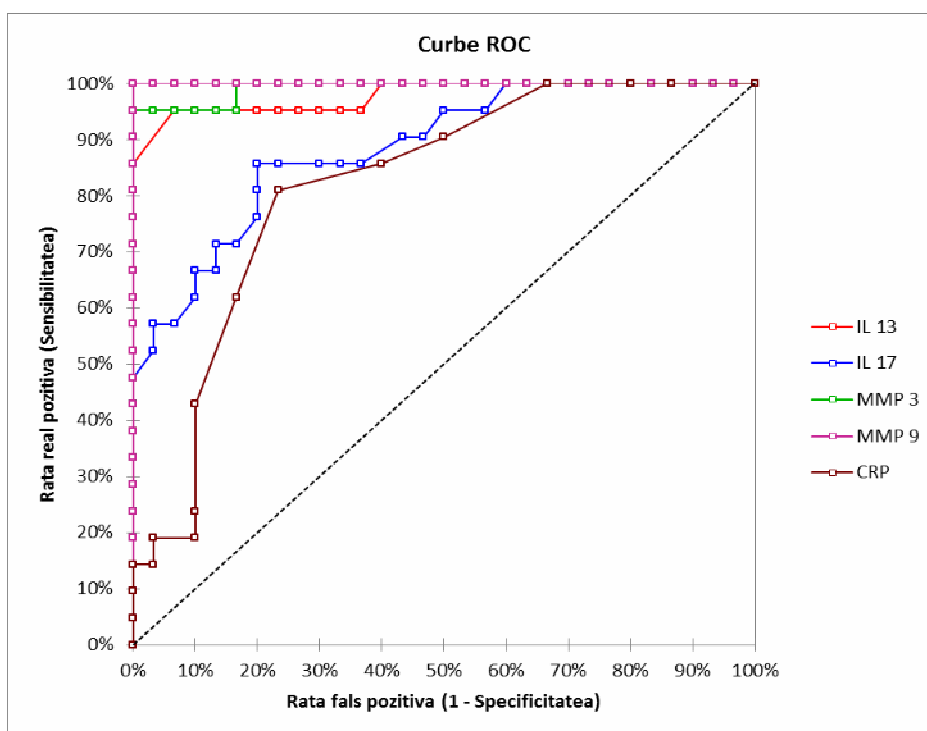


Figura 10. BC – curbele ROC ale markerilor serologici analizați

- De asemenea la compararea curbelor ROC pentru cei 5 parametri analizați în CU (Tabelul 9), am observat că separarea cea mai bună a bolnavilor cu CU se poate face cu ajutorul *MMP-9*, având cea mai performantă detecție (*acuratețe de 100%*) de a diagnostica, urmată de *IL-13* (*acuratețe de 92.80%*), cea mai puțin bună detecție făcându-se prin dozarea *IL-17*. Performanța/acuratețea diagnostică a CRP a fost cu puțin mai bună decât detecția prin dozarea MMP-3 (Figura 11).

<i>Parametru</i>	<i>AUC</i>	<i>Prag propus (cut-off)</i>	<i>Valoarea p AUC<>50%</i>	<i>Sensibilitate</i>	<i>Specificitate</i>
MMP-9	1.000	155 (- 410)	< 0.0001	100.00%	100.00%
IL-13	0.928	31.5 (30-33)	< 0.0001	86.96%	83.33%
<i>CRP</i>	<i>0.766</i>	<i>6.00</i>	<i>< 0.0001</i>	<i>73.91%</i>	<i>76.67%</i>
MMP-3	0.764	3.55	< 0.0001	71.74%	70.00%
IL-17	0.690	37.50	0.00146	65.22%	63.33%

Tabelul 9. CU – Performanța diagnostică a markerilor serologici

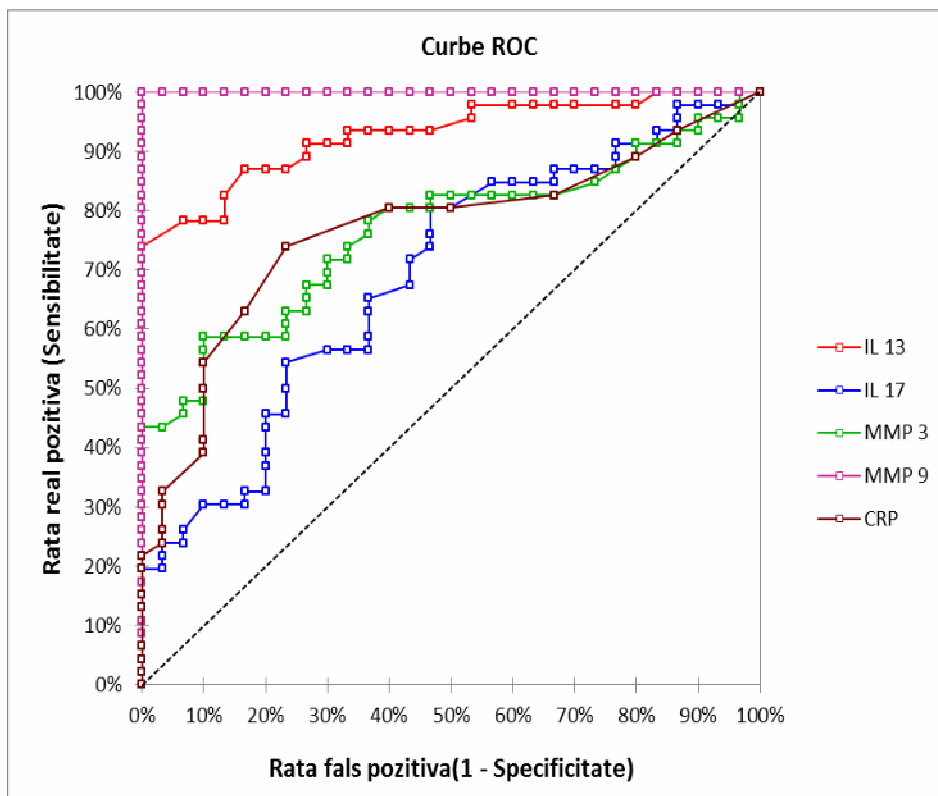


Figura 11. CU – curbele ROC ale markerilor serologici analizați

1. În studiul nostru am obținut, o performanță/acuratețe diagnostică superioară pentru dozarea metaloproteinazele matriceale, MMP-9 și MMP-3, comparativ cu dozarea CRP, în diagnosticarea corectă a pacienților cu sau fără boală intestinală inflamatorie.
2. De asemenea am identificat o performanță diagnostică mai bună pentru dozarea IL-13 comparativ cu determinarea serică a CRP la pacienții cu boală Crohn și colită ulcerativă.
3. Interleukina IL-17 a avut o performanță diagnostică mai bună decât dozarea serică a CRP, doar în diagnosticul pacienților cu boală Crohn.
4. Datorită sensibilității și specificității superioare, putem considera metaloproteinazele matriceale și interleukinele analizate ca o alternativă diagnostică sau suplimentară la CRP, VSH și alți indici inflamatori de boală, utilizați în diagnosticul bolilor inflamatorii intestinale.

Capitolul XI. CONCLUZII GENERALE

1. Primul studiu epidemiologic efectuat în Centrul nostru de referință indică o incidență redusă a BC și a CU în județul Dolj ($0.82/10^5$ locuitori pe an, respectiv $1.26/10^5$ locuitori ; am constatat o incidență mai mare a CU comparativ cu BC). Datele sunt în concordanță cu observațiile anterioare furnizate de Centrul de referință București și confirmă incidența scăzută a bolilor inflamatorii intestinale în România.
2. Boala Crohn a debutat la o vârstă mai tânără, având o distribuție echilibrată cu o ușoară preponderență a sexului feminin și cu un singur vârf de incidență, în timp ce colita ulcerativă a avut o vârstă de debut similară cu cea din populația vestică, cu o distribuție bimodala a incidenței la femei și repartitie egală pe sexe.
3. La nivelul județului Dolj, observăm că vârsta de debut pentru cele două entități clinico-patologice este cu 5 ani mai mare comparativ cu vârsta populației țărilor

Central și Vest Europene. Se constată o tendință de apariție a CU la vârste mai tinere în ultimii ani.

4. Din punct de vedere al localizării leziunilor am observat că peste jumătate din cazurile nou-diagnosticate cu BC au prezentat afectare colonică. Colita stângă a predominat la pacienții cu CU. Observăm o progresie fenotipică a bolii în timp, la pacienții nou-diagnosticați cu colită scade ponderea colitei stângi, se dublează ponderea colitelor extinse și se înregistrează cazuri de proctită.
5. Fenotipului non-stenozant, non-penetrant (forma inflamatorie) este cel mai frecvent întâlnit în BC.
6. Formele ușoare și moderate au predominat în ambele entități. Absența manifestărilor perianale, frecvența scăzută a complicațiilor intestinale și a celor extra-intestinale în lotul nostru, sugerează o evoluție blândă a BC și a CU la nivelul județului Dolj.
7. Studiul nostru a evidențiat pentru prima dată, asocierea anumitor caracteristici fenotipice cu markerii serologici analizați în serul pacienților cu BII. Am obținut concentrații semnificativ mai mari ale MMP-3, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP în serul pacienților cu BII, comparativ cu lotul control. Concentrații semnificativ mai mari ale MMP-3 s-au observat la pacienții cu debut peste 40 ani (A3) a BC, la cei cu afectare colonică (L2), cu pattern non-stenozant, non-penetrant (B1) și penetrant/fistulizant (B3) și la pacienții cu extensie la nivelul colonului stâng (E2) a CU. Nivelurile serice ale MMP-9 s-au asociat cu debutul precoce al BC (sub 40 ani), la cei cu afectare ileală (L1), cu pattern stenozant (B2) și la pacienții cu localizare stângă a colitei (E2).
8. Citokina anti-inflamatoare IL-13 a prezentat valori serice semnificativ mai mari la pacienții cu debut peste 40 ani, cu afectare ileală și la pacienții cu colită stângă. Citokina pro-inflamatoare IL-17 s-a asociat cu debut sub 40 ani a BC, cu localizarea colonică și ileo-colonică și cu proctitele. Singurele concentrații serice semnificativ mai mari ale CRP au fost asociate colitei extinse.

9. În BC și CU am obținut concentrații serice semnificativ mai mari în subgrupurile de pacienți cu activitate ușoară, moderată și severă, comparativ cu lotul control și am demonstrat ca nivelurile serice ale MMP-3, MMP-9, IL-13, IL-17 și CRP se asociază semnificativ cu diferite stadii de activitate clinică ale celor două entități. În serul pacienților cu BC și fumători am identificat niveluri mai mari, semnificative, ale MMP-9 și IL-13 vs grupul foști-fumători și nefumători.
10. Am demonstrat în studiul nostru, prezența de corelații între activitatea bolilor inflamatorii intestinale la adulți și concentrațiile serice ale metaloproteinazelor matriceale, MMP-3 și MMP-9. În lotul pacienților cu boală Crohn, dintre proteinaze, concentrațiile serice ale MMP-3 s-au corelat mult mai bine cu indicii de boală evaluați, în timp ce pentru lotul pacienților cu colită ulcerativă, MMP-9 a prezentat niveluri serice corelate mult mai bine cu indicii evaluați pentru această entitate. De asemenea dintre citokine doar IL-17 a prezentat corelații cu scorul de boală HBI pentru BC și respectiv concentrații mai bine corelate cu indicii de boală în CU.
11. Utilizând analiza curbei ROC am obținut, o acuratețe diagnostică superioară pentru dozarea serică a metaloproteinazele matriceale, MMP-9 și MMP-3, comparativ cu dozarea CRP, în diagnosticarea corectă a pacienților cu sau fără boală intestinală inflamatorie. De asemenea dozarea serică a IL-13 a prezentat o performanță diagnostică mai bună comparativ cu determinarea serică a CRP la pacienții cu boală Crohn și colită ulcerativă. Determinarea serică a IL-17 a avut o performanță diagnostică mai bună decât cea a CRP, doar în diagnosticul pacienților cu BC.
12. Datorită sensibilității și specificității superioare, putem considera metaloproteinazele matriceale și interleukinele analizate ca o alternativă diagnostică sau suplimentară la CRP, VSH și alți indici inflamatori de boală, utilizați în diagnosticul bolilor inflamatorii intestinale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, et al. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol*, 2003; 9: 1646-1656.
2. Gheorghe C, Pascu O, Gheorghe L, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:1153–9.
3. Mocanu D, Catuneanu AM, Diculescu M, Gologan S, Spore I. Current epidemiologic trends in Crohn's disease: data from a tertiary referral centre in Bucharest. *Maedica A Journal of Clinical Medicine*, 2010 Volume 5 No.2, 95-101.
4. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39:690–697.
5. Lakatos L, Lakatos PL. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? *Postgrad Med J* 2006; 82:332-337.
6. Gheorghe C, Dimitriu A, Iacob R, et al. Epidemiological and phenotypic characteristics of IBD patients in Romania – results of a nationwide hospital-based registry. *J Gastrointestinal Liver Dis*, 2014; 23: Suppl. 1., 41-42.
7. Boldeanu MV, Isabela S, Gheonea DI, Ciurea T, et al. Epidemiological and phenotypic aspects of IBD patients in Referral Center of Craiova - retrospective study in period 2011 – 2014. *Current Health Sciences Journal*, 2014; Volume 40, Supplement 8 : 21-27.
8. Mijandrusic-Sincic B, Vucelic B, Persic M, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-Goranska county, Croatia, 2000–2004. *Scand J Gastroenterol*, 2006; 41:437–444.
9. Pavlovic-Calic N, Salkic NN, Gegic A, et al. Crohn's disease in Tuzla region of Bosnia and Herzegovina: a 12-year study (1995–2006). *Int J Colorectal Dis*, 2008; 23:957–964.
10. Salkic NN, Pavlovic-Calic N, Gegic A, et al. Ulcerative colitis in the Tuzla region of Bosnia and Herzegovina between 1995 and 2006: epidemiological and clinical characteristics. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2010; 22:346–353.
11. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; i: 514.
12. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: Final report on a therapeutic trial. *Br Med J*, 1955; 2: 1041-1048.

13. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*, 2007;13:254–261.
14. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, et al. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 404-409.
15. Lakatos L, Lajos S K, Gyula D . Incidence, Disease Phenotype at Diagnosis, and Early Disease Course in Inflammatory Bowel Diseases in Western Hungary, 2002–2006. *Inflamm Bowel Dis*, 2011; 17:2558–2565.
16. Kofla-Dlubacz A, Matusiewicz M, Krzystek-Korpacka M, Iwanczak B: Correlation of MMP-3 and MMP-9 with Crohn's Disease Activity in Children. *Dig Dis Sci*, 2012; 57:706–712.
17. Matusiewicz M, Neubauer K, Mierzchala-Pasierb M, et al. Matrix Metalloproteinase-9: Its Interplay with Angiogenic Factors in Inflammatory Bowel Diseases. *Disease Markers*, 2014: 1-8.
18. Gan X, Wong B, Wright SD, et al. Production of matrix metalloproteinase-9 in CaCO-2 cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2001 ; 21:93–98.
19. Lakatos G, Sipos F, Miheller P et al. The behavior of matrix metalloproteinase-9 in lymphocytic colitis, collagenous colitis and ulcerative colitis. *Pathology and Oncology Research*, 2012; 18:85–91.
20. Pedersen G, Saermark T, Kirkegaard T, Brynskov J. Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clin Exp Immunol*, 2008; 155:257–265.