

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Krystyna Słowińska-Solnica

**Ocena możliwości wykorzystania oznaczeń mediatorów stanu
zapalnego w diagnostyce choroby Leśniowskiego i Crohna**

Assessment of the possibility of using measurements of
inflammatory mediators in the diagnosis of Leśniowski-Crohn
disease

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej, Genetyki i
Nutrigenomiki Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu
Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Bogdan Solnica

Kraków, 2022

Dziękuję serdecznie mojej Promotorce, Pani dr hab. n. med. Małgorzacie Malczewskiej-Malec, prof. UJ za opiekę naukową, życzliwość i zaufanie, jakim mnie obdarzyła podczas pisania tej pracy.

Dziękuję bardzo Rodzinie, szczególnie mojej Siostrze, która dodawała mi otuchy i wierzyła we mnie oraz Koleżankom, które mnie wspierały.

Dziękuję serdecznie dr n. med. Dorocie Pawlicy-Gosiewskiej za inspirację i wszelką pomoc, bez której moja praca doktorska nie mogłaby powstać.

***„Nauka to podróż, która trwa przez całe życie, nieustannie odkrywając nowe cele”
Jim Stovall***

Spis treści

| | |
|---|----|
| 1. Wstęp | 2 |
| 2. Cele pracy | 4 |
| 3. Metodyka | 4 |
| 3.1. Grupa badana | 4 |
| 3.2. Badania laboratoryjne | 4 |
| 3.3. Analiza statystyczna | 4 |
| 4. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej | 5 |
| 5. Podsumowanie wyników | 21 |
| 6. Wnioski | 23 |
| 7. Piśmiennictwo | 24 |
| 8. Streszczenie | 26 |
| 9. Summary | 28 |
| 10. Oświadczenia współautorów publikacji | 30 |

1. Wstęp

Choroba Leśniowskiego i Crohna (ChLC), należąca do nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ), jest pełnościennym, przeważnie ziarniniakowym zapaleniem, mogącym objąć każdy odcinek przewodu pokarmowego. Charakterystyczną cechą są odcinkowe zmiany zapalne w jelicie cienkim lub grubym przedzielone zdrowymi fragmentami jelit. Proces zapalny prowadzi do włóknienia ściany jelita, czego konsekwencją może być zwężenie jego światła, powstawanie przetok i zaburzenia perystaltyki. Choroba ma przebieg przewlekły z naprzemiennymi okresami zaostrzeń i remisji [1-3]. ChLC dotyczy głównie osób w wysoko rozwiniętych krajach Europy Zachodniej i Ameryki Północnej. Obecnie roczna zapadalność w krajach Unii Europejskiej wynosi 5/100 tys. ludności. W Polsce nie ma dokładnych danych na temat epidemiologii tej choroby. Zapadają na nią przede wszystkim ludzie młodzi, w wieku 15-25 lat, z podobną częstością występowania u kobiet i mężczyzn. Obserwuje się też tendencję wzrostu zachorowań na ChLC u dzieci poniżej 10 roku życia, z bardzo nasilonymi objawami i ciężkim przebiegiem klinicznym [1,4].

Przyczyna choroby nie jest znana, aczkolwiek za istotny element jej patogenezы uważa się dysfunkcję śluzówkowego układu odpornościowego, na którą wpływają czynniki immunologiczne, genetyczne oraz mikrobiota jelitowa, modyfikowana przez czynniki środowiskowe, m.in. tryb życia, dietę, palenie papierosów [1,2,5,6]. Mutacje genu *NOD2/CARD15* białka regulującego aktywność makrofagów w odpowiedzi na antygeny bakteryjne (lipopolisacharyd) 20-40-krotnie zwiększają ryzyko wystąpienia choroby i warunkują wcześniejsze pojawienie się objawów. Dużą ekspresję genu *NOD2/CARD15* wykrywa się w komórkach Panetha, najliczniejszych w śluzówce jelita cienkiego. Komórki te, za pośrednictwem defensyn i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) wydzielanych do światła jelita, pełnią funkcję obronną przed drobnoustrojami patogennymi oraz regulują skład bakterii komensalnych jelit [1,2,4,5,6].

Istotną rolę w inicjacji i rozwoju stanu zapalnego odgrywają zwiększenie przepuszczalności nabłonka jelitowego spowodowane dysfunkcją połączeń ścisłych (*Tight Junctions*) między komórkami [7] oraz zaburzenia procesów rozpoznawania wzorców molekularnych drobnoustrojów i składników pokarmowych przez receptory PRR (*pattern recognition receptors*) komórek odporności wrodzonej obecnych w nabłonku i blaszce właściwej ściany jelita. Największą ekspresją PRR z programowaniem komórek odpornościowych w kierunku tolerancji lub reakcji immunologicznej cechują się komórki dendrytyczne [2,8]. Aktywność ChLC jest związana z dystrybucją i fenotypami tych receptorów [9,10].

Układ odporności nabytej prawdopodobnie nie inicjuje procesu zapalnego w ChLC, ale pośredniczy w nim i go utrwala [2]. W ChLC stwierdza się wzmożoną aktywność komórek Th1 ze zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych, które promują silne odpowiedzi typu komórkowego. Badania nad mikrobiomem jelit dowodzą, że do polaryzacji w kierunku Th1 dochodzi pod wpływem komensalnych oportunistycznych bakterii lub niektórych innych patogenów. Indukowana jest wtedy odpowiedź typu komórkowego Th1- lub Th-17-zależna. Ta droga aktywacji, w przypadku jej dysregulacji odpowiada za rozwój schorzeń autoimmunizacyjnych oraz NChZJ [6]. Uważa się także, że w ChLC można zaobserwować obniżoną funkcję regulatorowych limfocytów T (Treg) [8].

Za główny mechanizm zapalenia jelit w ChLC przyjmuje się brak równowagi pomiędzy efektorowymi limfocytami Th1 i Th17 działającymi poprzez wydzielanie interferonu γ (IFN- γ), TNF- α , prozapalnych interleukin (IL) jak IL-6, IL-12, IL-17, IL-22 i innych mediatorów, a komórkami Treg wydzielającymi IL-10 i IL-35 oraz transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) [1,2,5].

W patogenezę ChLC zaangażowane są zatem liczne cytokiny i inne mediatory o działaniu prozapalnym i przeciwzapalnym, niejednokrotnie współdziałając w układach (sieciach) cytokin [2,5,11-15]. Spośród wiodących w patogenezie ChLC cytokin, IFN- γ poza działaniem prozapalnym hamuje aktywność komórek Th2 osłabiając działanie bariery nabłonkowej i naczyniowej w ścianie jelita, IL-12 indukuje polaryzację Th1 z wydzielaniem IFN- γ , TNF- α i innych mediatorów oraz współdziała z IL-23 w pobudzaniu różnicowania komórek Th17, a osłabienie IL-17/IL-23 odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu stanu zapalnego, aktywne limfocyty Th17 są bowiem źródłem IL-6 i IL-17. Z kolei IL-10 jest kluczową cytokiną przeciwzapalną hamującą wytwarzanie cytokin prozapalnych i inne funkcje komórek immunokompetentnych. Podobne działanie przypisuje się IL-19, hamującej wydzielanie cytokin prozapalnych przez makrofagi oraz limfocyty Th1 i Th2.

Za udziałem tych prozapalnych mediatorów w patogenezie i ich wpływem na przebieg kliniczny ChLC przemawia stwierdzone w licznych pracach większe ich stężenie we krwi chorych, nieraz pozostające w związku z aktywnością choroby, a w przypadku IL-12 i IL-23 także większa ekspresja w bioptatach błony śluzowej jelita u chorych w porównaniu ze zdrowymi osobami z grup kontrolnych. U osób z ChLC opisywano większe stężenia we krwi również IL-10 i IL-19, cytokin przeciwzapalnych. Ponadto stwierdzono, że mutacje w genach IL-10 lub jej receptora zwiększają podatność na NChZJ, a upośledzona ekspresja IL-19 i reakcja komórek na nią przyczyniają się do procesu zapalnego w aktywnej ChLC.

Rozpoznanie ChLC jest oparte na obrazie klinicznym, endoskopii (kolonoskopii) z badaniem histologicznym oraz badaniach laboratoryjnych. Te ostatnie służą do stwierdzenia / potwierdzenia stanu zapalnego, będącego istotą choroby. Wykorzystuje się w tym celu mało swoiste markery zapalne [1-4,16].

W ocenie przebiegu ChLC powszechnie stosuje się wskaźnik jej aktywności (*Crohn's Disease Activity Index*, CDAI) – skalę punktową oceniającą ogólne samopoczucie, dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego oraz dane kliniczne wskazujące na stan zapalny. Do oceny aktywności choroby służy również endoscopia i badania obrazowe.

Pomimo już ugruntowanej i rozwijającej się wiedzy na temat roli wymienionych cytokin, w tym układów cytokin, jak IL-12/IL-23 i IL-17/IL-23, w patogenezie i przebiegu ChLC, w praktyce klinicznej mediatory te nie znajdują zastosowania w rozpoznawaniu tej choroby ani ocenie jej aktywności. Jedyne badania wydzielania IFN- γ są stosowane w różnicowaniu ChLC i gruźlicy jelit [17]. Wśród licznych badań stężeń cytokin we krwi w ChLC [18-20] rzadko ocenia się ich charakterystykę diagnostyczną w rozpoznawaniu i ocenie aktywności choroby. Takie badania powinny być punktem wyjścia w ocenie cytokin jako markerów w diagnostyce ChLC.

2. Cele pracy

- 1) Porównanie stężenia białka C-reaktywnego (CRP) oraz wybranych cytokin prozapalnych (IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-23) i przeciwzapalnych (IL-10, IL-19) w surowicy i iloczynów ich stężeń u pacjentów z ChLC, jej postacią aktywną i nieaktywną i grupą kontrolną oraz ocena korelacji stężeń badanych markerów / mediatorów z wartościami CDAI.
- 2) Określenie i ocena charakterystyki diagnostycznej badanych markerów / mediatorów w rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC i jej aktywnej postaci.

3. Metodyka

3.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 49 pacjentów z ChLC, którzy byli hospitalizowani w Oddziale Klinicznym Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Rozpoznanie ChLC było oparte na obrazie klinicznym oraz wynikach kolonoskopii z badaniem histologicznym i badań laboratoryjnych. Na podstawie wartości CDAI pacjenci z ChLC zostali podzieleni na grupy z aktywną (33 pacjentów) i nieaktywną (16 pacjentów) postacią choroby. Grupę kontrolną stanowiło 31 zdrowych ochotników. Badanie otrzymało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, wszyscy jego uczestnicy byli poinformowani o protokole i celach badania oraz udzielili pisemnej zgody na udział.

3.2. Badania laboratoryjne

Materiałem badanym była surowica krwi żyłnej, próbki pobierano na czczo. Stężenie CRP w surowicy oznaczano metodą immunonefelometryczną, a cytokin (IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-19 i IL-23) – metodą ELISA.

3.3. Analiza statystyczna

Stężenia badanych markerów/mediatorów porównano pomiędzy pacjentami z ChLC i grupą kontrolną oraz pomiędzy pacjentami z aktywną i nieaktywną postacią choroby oraz grupą kontrolną. Badano także korelację tych stężeń z wartościami CDAI. Takim samym porównaniom poddano iloczyny stężeń badanych markerów / mediatorów: [IL-6]x[CRP], [IL-17A]x[CRP], [IL-23]x[CRP], [IL-6]x[IL-17A], [IL-6]x[IL-23], [IL-17A]x[IL-23], [IL-6]x[IL-10], [IL-6]x[IL-19], [IL-6]x[IFN- γ], [CRP]x[IL-10], [CRP]x[IL-19], [CRP]x[IFN- γ], [IL-10]x[IL-19], [IL-10]x[IFN- γ] i [IL-19]x[IFN- γ].

Charakterystyka diagnostyczna badanych markerów / mediatorów oraz iloczynów ich stężeń w rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC oraz jej aktywnej postaci obejmowała czułość i swoistość diagnostyczną, wartości predykcyjne (PPV, NPV) i ilorazy prawdopodobieństw (LR+, LR-) dla wyników dodatnich i ujemnych oraz pole pod krzywą ROC (*receiver operating characteristics*) (AUC).

4. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej

- 1) Słowińska-Solnica K, Pawlica-Gosiewska D, Gawlik K, Owczarek D, Cibor D, Pocztar H, Mach T, Solnica B. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity. Arch Med Sci 2021; 17 (1): 252–257.
Impact Factor: 3,707; punktacja MEN:100' Index Copernicus: 176,07
- 2) Słowińska-Solnica K, Pawlica-Gosiewska D, Gawlik K, Owczarek D, Cibor D, Solnica B, Malczewska-Malec M. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity. Arch Med Sci 2022; DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>
Impact Factor: 3,707; punktacja MEN:100' Index Copernicus: 176,07

Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity

Krystyna Słowińska-Solnica¹, Dorota Pawlica-Gosiewska¹, Katarzyna Gawlik¹, Danuta Owczarek^{2,3}, Dorota Cibor^{2,3}, Halina Pocztar^{2,3}, Tomasz Mach^{2,3}, Bogdan Solnica¹

¹Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

²Department of Gastroenterology and Hepatology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

³Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital, Krakow, Poland

Submitted: 20 November 2020

Accepted: 24 November 2020

Arch Med Sci 2021; 17 (1): 252–257

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/130842>

Copyright © 2020 Termedia & Banach

Corresponding author:

Prof. Bogdan Solnica
Department of
Clinical Biochemistry
Jagiellonian University
Medical College
Krakow, Poland
Phone: +48 12 421 40 06
E-mail: mbsolnic@cyf-kr.edu.pl

Abstract

Introduction: The aim of our study was to evaluate the diagnostic characteristics of selected inflammatory markers and the results of multiplication of their concentrations in the diagnosis and assessment of Crohn's disease (CD) activity.

Methods: We studied 49 patients with CD and 31 healthy controls. The CD patients were assigned to subgroups with active and inactive disease based on the Crohn's Disease Activity Index score. Serum interleukins and C-reactive protein (CRP) were measured using immunoassays.

Results: Serum CRP and interleukins: IL-6, IL-17A, IL-23 were significantly higher in the CD group than in controls, with the best diagnostic performance for IL-23. Only serum IL-6 and CRP were significantly higher in active than in inactive disease, with the better performance of CRP. Multiplication results did not perform better than individual multipliers.

Conclusions: Serum CRP may be useful in the assessment of CD activity and there is a need for introduction of IL-23 for the CD diagnosis.

Key words: inflammatory bowel disease, cytokines, C-reactive protein, Crohn's disease activity index.

Crohn's disease (CD) is a chronic transmural intestinal inflammation affecting various parts of the gastrointestinal tract. Diagnosis of CD is based on the history and physical examination, imaging studies including magnetic resonance, endoscopy and histology, and laboratory tests [1, 2].

Laboratory tests are additional tools in the CD diagnosis and include antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* and inflammatory markers such as erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum C-reactive protein (CRP) or interleukin 6 (IL-6), and fecal calprotectin (FC). Except for FC, inflammatory markers are not routinely used in the diagnosis of CD. However, under certain clinical circumstances, these markers may be helpful in differentiating inflammatory bowel disease (IBD) from non-inflammatory disorders such as irritable bowel syndrome and in establishing a further diagnostic strategy.

The clinical status of CD patients is often assessed using the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) calculated using clinical and laboratory data including general well-being, number of abnormal stools, abdominal pain, arthritis/arthralgia, mucocutaneous lesions, iritis/uveitis, fever, hematocrit and others [3]. However, some criteria included in the CDAI are scored by the patients subjectively and some of them may require extended diagnostics, e.g. eyes examination or osteoarticular assessment. Therefore, the use of CDAI can be time consuming, inconvenient for the patient and sometimes not completely reliable. Another approach is endoscopy and cross-sectional imaging techniques with the use of ultrasound, computed tomography and magnetic resonance imaging. However, these diagnostic procedures have several disadvantages [4, 5]. As inflammation plays a key role in the pathogenesis and clinical course of CD, the use of inflammatory markers is another option in assessing disease activity.

Fecal calprotectin and serum CRP are broadly studied and used for CD activity assessment in clinical practice [6, 7]. However, IL-6, IL-17A and IL-23 (IL-23/IL-17 axis), despite their well-documented role in triggering and maintaining the mucosal inflammation, still remain candidate markers. The availability of simple laboratory tests instead of quite complicated scoring systems and/or endoscopy could make CD activity assessment easier and faster. Many approaches to use biomarkers for this purpose have been studied with conflicting results [4, 5, 8–12].

In this study, we aimed to evaluate the diagnostic characteristics of selected inflammatory markers including serum CRP, IL-6, IL-17A, IL-23, and the results (products) of multiplication of their concentrations in the diagnosis of CD and in the assessment of disease activity.

Methods. We studied 49 patients with CD, aged from 22 to 50 years and 31 healthy controls aged from 20 to 61 years. The study was conducted in years 2018–2019 and the patients were enrolled consecutively in the Department of Gastroenterology and Hepatology of the University Hospital, Krakow, Poland. The diagnosis of CD was based on the patient's history, physical examination and colonoscopy with histology. All CD patients studied were treated at the time of enrollment. The therapies used included glucocorticoids, 6-mercaptopurine, 5-aminosalicylate, Infliximab and antibiotics. In all CD patients the CDAI score was calculated and they were assigned to subgroups with active (CDAI score \geq 150, 33 patients) and inactive (CDAI score $<$ 150, 16 patients) disease. Informed consent was signed by each subject prior to enrolling in the study. The Bioethical Committee of the Jagiellonian University, Krakow, Poland, approved the study.

Serum concentrations of IL-6, IL-17A and IL-23 were measured using ELISA reagent kits. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was measured using the immunonephelometric assay on the Nephelometer II Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics). The results of multiplication of concentrations: $[\text{IL-6}] \times [\text{CRP}]$, $[\text{IL-17A}] \times [\text{CRP}]$, $[\text{IL-23}] \times [\text{CRP}]$, $[\text{IL-6}] \times [\text{IL-17A}]$, $[\text{IL-6}] \times [\text{IL-23}]$ and $[\text{IL-17A}] \times [\text{IL-23}]$ were calculated using standard units (mg/l for CRP, pg/ml for interleukins).

Statistical analysis. Data distribution was analyzed using the Shapiro-Wilk test. All variables in our study showed a nonparametric distribution, and therefore the results are presented as medians and interquartile ranges [Q1-Q3]. Medians were compared using the Kruskal-Wallis Anova test and the Dunn Test. The significance level of $p < 0.05$ was applied.

Diagnostic characteristics in differentiating between the presence and absence of CD and between active and inactive disease were assessed using Receiver Operating Characteristics (ROC) curve analysis to select appropriate cut-off values and calculations of diagnostic sensitivity and specificity, positive and negative predictive value, and area under the ROC curve (AUC). All analyzes were performed using the Statistica 13 software (StatSoft Poland).

Results. Serum levels of CRP, IL-6, IL-17A and IL-23 were significantly higher in the CD group than in controls (Table I). In the diagnosis of CD, IL-23 had the most favorable diagnostic characteristics while other markers performed worse with AUC $<$ 0.8 (Table II). All results (products) of multiplication of concentrations differed significantly between CD patients and the control group (Table I). The diagnostic characteristics of these products were better than those of the individual factors, but still the best performance was found for serum IL-23 multiplied by CRP, IL-6 and IL-17A levels. Also, the performance of $[\text{IL-6}] \times [\text{CRP}]$ was slightly better than that of IL-6 and CRP separately (Table II).

In the group of patients with CD, only serum CRP and IL-6 were significantly higher in active than in inactive disease (Table I). In differentiating active and inactive CD with cut-off values other than for the diagnosis, the best diagnostic performance was found for CRP whereas IL-6, IL-17A and IL-23 performed worse. The multiplication of serum levels slightly improved their diagnostic performance as combined markers (Table II).

Discussion. In this study, we evaluated CRP and inflammatory cytokines reported to be associated with CD pathogenesis and clinical course, i.e. IL-6, IL-17A, IL-23 and the results of multiplication of their concentrations as combined markers in the CD diagnosis and disease activity assessment.

We observed serum CRP levels as well as the results of multiplications: $[\text{IL-6}] \times [\text{CRP}]$, $[\text{IL-17A}] \times$

Table I. Comparison of median values (IQR) of serum inflammatory makers and the results of multiplication of their concentrations in CD patients and controls and in patients with active and inactive CD

| Marker | Crohn's disease (n = 49) | Control group (n = 31) | P-value |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------|
| | Median (IQR) | | |
| CRP [mg/l] | 3.48 (1.03–20.62) | 0.51 (0.16–1.74) | 0.0001 |
| IL-6 [pg/ml] | 3.24 (1.50–7.35) | 1.35 (0.77–1.96) | < 0.0001 |
| IL-17A [pg/ml] | 2.01 (1.26–3.48) | 0.93 (0.47–1.88) | 0.0001 |
| IL-23 [pg/ml] | 23.3 (18.0–36.0) | 5.78 (3.70–7.79) | < 0.0001 |
| [IL-6] × [CRP] | 17.8 (1.38–111.39) | 0.35 (0.00–8.34) | < 0.0001 |
| [IL-17A] × [CRP] | 7.18 (1.30–40.92) | 0.35 (0.00–8.34) | < 0.0001 |
| [IL-23] × [CRP] | 108.22 (16.76–579.80) | 2.47 (0.70–10.32) | < 0.0001 |
| [IL-6] × [IL-17A] | 6.51 (2.50–17.39) | 1.49 (0.01–15.42) | < 0.0001 |
| [IL-6] × [IL-23] | 93.53 (32.86–227.93) | 6.71 (4.01–13.44) | < 0.0001 |
| [IL-17A] × [IL-23] | 52.10 (30.07–109.40) | 4.43 (2.25–10.75) | < 0.0001 |
| Marker | Inactive CD CDAI < 150 (n = 16) | Active CD CDAI ≥ 150 (n = 33) | P-value |
| CRP [mg/l] | 1.14 (0.46–2.56) | 10.85 (2.96–28.12) | 0.000130 |
| IL-6 [pg/ml] | 2.05 (1.01–3.20) | 4.35 (2.16–9.00) | 0.025885 |
| IL-17A [pg/ml] | 2.01 (1.23–3.34) | 2.01 (1.26–3.70) | 0.639040 |
| IL-23 [pg/ml] | 20.90 (16.54–26.82) | 26.65 (19.36–37.04) | 0.132823 |
| [IL-6] × [CRP] | 2.39 (0.02–24.66) | 41.38 (0.04–3388.08) | < 0.0001 |
| [IL-17A] × [CRP] | 2.13 (0.50–24.92) | 19.97 (0.02–557.33) | < 0.0001 |
| [IL-23] × [CRP] | 21.66 (9.33–51.68) | 422.15 (68.19–790.87) | < 0.0001 |
| [IL-6] × [IL-17A] | 4.40(0.33–35.24) | 7.53 (0.12–510.44) | < 0.0001 |
| [IL-6] × [L-23] | 43.93 (27.62–103.60) | 114.26 (42.91–268.33) | < 0.0001 |
| [IL-17A] × [IL-23] | 37.10 (23.13–83.97) | 59.37 (33.19–151.79) | < 0.0001 |

CD – Crohn's disease, CDAI – Crohn's disease activity index, IQR – interquartile range.

[CRP], [IL-23] × [CRP] significantly higher in the CD group than in controls (Table I). However, the performance of serum CRP in the diagnosis of CD was rather poor and only slightly improved after multiplication by IL-6, IL-17A and IL-23 levels (Table II). These findings seem to exclude the use of CRP in the diagnosis of CD. However, the slight differences in serum CRP between the studied group and controls (Table I) and the observed poor diagnostic performance were largely due to by the CD treatment of patients studied, which is a limitation of this analysis.

Serum CRP and FC are the most broadly evaluated and frequently used markers of CD activity [5, 6, 13]. Increased serum CRP levels were reported in patients with CD and associated with the disease activity [2, 6, 14, 15]. In our study, serum CRP was significantly higher in CD patients with active than with inactive disease (Table I). CRP had diagnostic sensitivity of 0.72, which means 72%

agreement with the CDAI, diagnostic specificity and PPV equal to 1.0 and good overall performance (Table II). Multiplication of serum CRP by IL-6, IL-17A and IL-23 levels did not improve diagnostic characteristics of these combined markers. It is noteworthy that similar diagnostic performance was reported for FC [16–18].

Diagnostic performance of CRP found in our study was close to reported in comparison with endoscopic assessment of CD activity [19], when combined with FC for selecting patients with suspected CD of the small bowel for capsule endoscopy [20] and together with CDAI and fecal calprotectin to predict the outcome after anti-tumor necrosis factor (TNF) induction therapy [21]. Altogether, our and published data indicate that serum CRP reliably assesses the clinical activity of CD.

IL-6 is considered a central cytokine in the CD pathogenesis and propagation [22, 23]. We found that its serum levels as well as the results of mul-

Table II. Diagnostic characteristics of serum inflammatory markers and the results of multiplication of their concentrations in the diagnosis of CD and the differentiation of active and inactive disease

| Marker | Cut-off value | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV | AUC |
|---|---------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|
| The diagnosis of CD: | | | | | | |
| CRP [mg/l] | 2.69 | 0.592 | 0.933 | 0.935 | 0.583 | 0.761 |
| IL-6 [pg/ml] | 2.16 | 0.673 | 0.839 | 0.868 | 0.619 | 0.765 |
| IL-17A [pg/m] | 1.06 | 0.878 | 0.548 | 0.754 | 0.739 | 0.757 |
| IL-23 [pg/ml] | 15.02 | 0.959 | 0.968 | 0.979 | 0.938 | 0.994 |
| [IL-6] × [CRP] | 12.7 | 0.571 | 1.000 | 1.000 | 0.596 | 0.791 |
| [IL-17A] × [CRP] | 3.3 | 0.694 | 0.935 | 0.944 | 0.659 | 0.846 |
| [IL-23] × [CRP] | 29.1 | 0.735 | 1.000 | 1.000 | 0.705 | 0.904 |
| [IL-6] × [IL-17A] | 2.5 | 0.776 | 0.774 | 0.844 | 0.686 | 0.799 |
| [IL-6] × [L-23] | 16.9 | 0.898 | 0.935 | 0.957 | 0.853 | 0.939 |
| [IL-17A] × [IL-23] | 21.4 | 0.857 | 0.935 | 0.955 | 0.806 | 0.947 |
| The differentiation of active and inactive disease: | | | | | | |
| CRP [mg/l] | 4.54 | 0.72 | 1.00 | 1.00 | 0.64 | 0.841 |
| IL-6 [pg/ml] | 2.78 | 0.70 | 0.75 | 0.85 | 0.55 | 0.699 |
| IL-17A [pg/ml] | 0.99 | 0.94 | 0.19 | 0.71 | 0.60 | 0.543 |
| IL-23 [pg/ml] | 15.5 | 0.97 | 0.19 | 0.71 | 0.75 | 0.634 |
| [IL-6] × [CRP] | 19.6 | 0.70 | 0.94 | 0.96 | 0.60 | 0.801 |
| [IL-17A] × [CRP] | 7.2 | 0.73 | 0.94 | 0.96 | 0.63 | 0.822 |
| [IL-23] × [CRP] | 0.77 | 1.00 | 0.06 | 0.69 | 1.00 | 0.854 |
| [IL-6] × [IL-17A] | 0.80 | 0.94 | 0.25 | 0.72 | 0.67 | 0.618 |
| [IL-6] × [L-23] | 50.1 | 0.73 | 0.63 | 0.80 | 0.53 | 0.712 |
| [IL-17A] × [IL-23] | 12.7 | 0.97 | 0.13 | 0.70 | 0.67 | 0.616 |

CD – Crohn's disease, NPV – negative predictive value, PPV – positive predictive value, AUC – area under the ROC curve.

tiplication of concentrations were significantly higher in patients with CD than in controls. The performance of IL-6 in the CD diagnosis was better than CRP and multiplication [IL-6] × [CRP] improved it slightly but still with AUC < 0.8 (Table II). With a similar limitation as in the case of CRP, the overall diagnostic performance of IL-6 is inferior to that required for clinical practice purposes.

IL-6 is also a candidate marker for CD course and treatment monitoring. It was demonstrated to be associated with disease activity [22–25], to predict endoscopic IBD activity in combination with serum amyloid A (SAA), IL-8, and eotaxin-1 [26], and to predict the response to biologic treatment in CD patients [27, 28]. However, there are also reports that do not confirm the diagnostic utility of IL-6 in CD [29]. We found serum IL-6 significantly higher in CD patients with active than inactive disease (Table I). The ratio of median serum IL-6 in active and inactive CD of 2.12 was similar to that reported by Mavropoulou *et al.* [25],

but lower than in a study by Nikolaus *et al.* [24]. Diagnostic performance of IL-6 in differentiating active and inactive disease was in our study worse than that of CRP (Table II).

CRP is synthesized and secreted by hepatocytes under the influence of IL-6, and their serum levels usually correlate. We evaluated diagnostic characteristics of the results of multiplication [IL-6] × [CRP]. The values of this combined marker differed significantly between patients with active and inactive CD, and its diagnostic performance was better than that of IL-6 but worse than that of CRP (Tables I, II). In conclusion, contrary to the published data mentioned above, IL-6 is not a suitable single marker also for the differentiation of active and inactive CD.

Th17 cells and the IL-17/IL-23 axis play an important role in the pathogenesis and clinical course of CD [30, 31]. Additionally, IL-6 and IL-17 are inflammatory mediators produced by activated Th17 cells [32]. However, evidence for the

diagnostic utility of IL-17 and IL-23 in CD/IBD is scarce and reports are discordant [33–35]; more attention is paid to these cytokines as a therapeutic target [36, 37]. In our study, serum IL-17A and IL-23 as well as the results of multiplication of their concentrations were significantly higher in treated CD patients compared to controls. In the diagnosis of CD serum IL-23 performed best among all studied markers, while the diagnostic characteristics of IL-17A were comparable to those of IL-6 (Table I). The diagnostic performance of the multiplication results was markedly better than that of serum CRP and IL-6 but still slightly worse than with IL-23 as a single marker (Table II). The diagnostic performance of IL-23 may be related to the involvement of the IL-17/IL-23 axis in CD pathogenesis. However, this was not the case with IL-17A and IL-6.

Interestingly, serum levels of IL-17A and IL-23 did not differ significantly between CD patients with active and inactive disease, but their multiplication results did (Table I). The performance of IL-17A and IL-23 in differentiating active and inactive CD was poor (Table II). Multiplying serum levels of IL-17A and IL-23 by CRP made the diagnostic performance of these combined markers comparable to CRP (Table II). Thus, both IL-17A and IL-23 cannot be recommended as markers of CD activity.

Laboratory markers of inflammation are hardly used in the diagnosis of CD and the assessment of its activity. We found good performance characteristics of IL-23 in the diagnosis of CD and CRP in the assessment of disease activity. We also evaluated the results of multiplication of concentrations as combined inflammatory markers, but their diagnostic performance was not better compared to the individual multipliers to a degree authorizing their use in clinical practice.

Measurement of inflammatory markers in serum can be performed together with other tests necessary for care of CD patients, such as complete blood count or serum albumin. In general, laboratory markers used instead of or in selecting patients for endoscopy or other imaging studies could make the CD diagnosis and the assessment of its activity easier, more convenient and less expensive. Promising diagnostic performance of CRP and IL-23 found in our study in a relatively small group of CD patients should be considered preliminary. It has to be emphasized, however, that currently CRP is measured routinely, while the IL-23 ELISA reagent kits are approved for research use only. Thus, our results suggest the utility of serum CRP in assessment of CD activity, and the need for validation and approval of IL-23 assays for the CD diagnosis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 1088-1103.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380: 1590-606.
3. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-44.
4. Bourgonje AR, von Martels JZH, Gabriëls RY, et al. A combined set of four serum inflammatory biomarkers reliably predicts endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease. *Front Med* 2019; 6: 251.
5. Benitez JM, Meuwis MA, Reenaers C, Van Kemseke C, Meunier P, Louis E. Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* 2013; 62: 1806-16.
6. Ma C, Battat R, Parker CE, Khanna R, Jairath V, Feagan BG. Update on C-reactive protein and fecal calprotectin: are they accurate measures of disease activity in Crohn's disease? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 13: 319-30.
7. Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 11246-59.
8. Singha UP, Singha NP, Murphya EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 2016; 77: 44-9.
9. Hoekman DR, Diederens K, Koot BGR, Tabbers MM, Kindermann A, Benninga MA. Relationship of clinical symptoms with biomarkers of inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Eur J Pediatr* 2016; 175: 1335-42.
10. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006; 55: 426-31.
11. Szczeklik K, Mach T, Cibor D, et al. Correlation of paraoxonase-1 with the severity of Crohn's disease. *Molecules* 2018; 23: 2603.
12. Szczeklik K, Krzyściak W, Cibor D, et al. Markers of lipid peroxidation and antioxidant status in the serum and saliva of patients with active Crohn disease. *Pol Arch Intern Med* 2018; 128: 362-70.
13. Mak LY, Tong TSM, Cheung KS, et al. Combined use of common fecal and blood markers for detection of endoscopically active inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol* 2020; 11: e00138.
14. Shiga H, Abe I, Onodera M, et al. Serum C-reactive protein and albumin are useful biomarkers for tight control management of Crohn's disease in Japan. *Sci Rep* 2020; 10: 511.
15. Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 11246-59.
16. Vázquez-Morón JM, Pallarés-Manrique H, Machancoses FH, Ramos-Lora M, Ruiz-Frutos C. Accurate cut-offs for predicting endoscopic activity and mucosal healing in Crohn's disease with fecal calprotectin. *Rev Esp Enferm Dig* 2017; 109: 130-6.
17. Scafoli E, Cardamone C, Scaglmarini M, Zagari RM, Bazzoli F, Belluzzi A. Can fecal calprotectin better stratify Crohn's disease activity index? *Ann Gastroenterol* 2015; 28: 247-52.
18. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's

- Disease Activity Index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 40-6.
19. Mitselos IV, Katsanos KH, Tatsioni A, et al. Association of clinical and inflammatory markers with small bowel capsule endoscopy findings in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018; 30: 861-7.
 20. Egea-Valenzuela J, Pereñíguez-López A, Pérez-Fernández V, Alberca-de-las-Parras F, Carballo-Álvarez F. Fecal calprotectin and C-reactive protein are associated with positive findings in capsule endoscopy in suspected small bowel Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2016; 108: 394-400.
 21. Sollelis E, Quinard RM, Bouguen G, et al. Combined evaluation of biomarkers as predictor of maintained remission in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2019; 25: 2354-64.
 22. Mudter J, Neurath MF. IL-6 Signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1016-23.
 23. Takač B, Mihaljević S, Štefanić M, Glavas-Obrovac L, Kibel A, Samardžija M. Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Coll Antropol* 2014; 38: 659-64.
 24. Nikolaus S, Waetzig GH, Butzin S, et al. Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 2018; 33: 927-36.
 25. Mavropoulou E, Mechie NC, Knoop R, et al. Association of serum interleukin-6 and soluble interleukin-2-receptor levels with disease activity status in patients with inflammatory bowel disease: a prospective observational study. *PLoS One* 2020; 15: e0233811.
 26. Bourgonje AR, von Martels JZH, Gabriëls RY, et al. A combined set of four serum inflammatory biomarkers reliably predicts endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease. *Front Med* 2019; 6: 251.
 27. Caviglia GP, Rosso C, Stalla F, et al. On-treatment decrease of serum interleukin-6 as a predictor of clinical response to biologic therapy in patients with inflammatory bowel diseases. *J Clin Med* 2020; 9: 800.
 28. Suzuki Y, Matsui T, Ito H, et al. Circulating interleukin 6 and albumin, and infliximab levels are good predictors of recovering efficacy after dose escalation infliximab therapy in patients with loss of response to treatment for Crohn's disease: a prospective clinical trial. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 2114-22.
 29. Nancey S, Hamzaoui N, Moussata D, et al. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 242-7.
 30. Ruiz de Moralesa JMG, Puig L, Daudén E, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: an updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev* 2020; 19: 102429.
 31. Cătană CS, Berindan Neagoe I, Cozma V, Magdaş C, Tăbaran F, Dumitraşcu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 5823-30.
 32. Yen D, Cheung J, Scheerens H et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-6.
 33. Sahin A, Calhan T, Cengiz M, Kahraman R, et al. Serum interleukin 17 levels in patients with Crohn's disease: real life data. *Dis Markers* 2014; 2014: 690853.
 34. Liu QL, Huang L, Zhao QJ, Li Q, He Z. Relationship between serum interleukin-17 level and inflammatory bowel disease. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016; 30: 181-8.
 35. Karczewski J, Swora-Cwynar E, Rzymiski P, Poniedziałek B, Adamski Z. Selected biologic markers of inflammation and activity of Crohn's disease. *Autoimmunity* 2015; 48: 318-27.
 36. Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16: 185-96.
 37. Furfaro F, Gilardi D, Allocca M, et al. IL-23 blockade for Crohn's disease: next generation of anti-cytokine therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13: 457-67.

Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity

Krystyna Słowińska-Solnica¹, Dorota Pawlica-Gosiewska¹, Katarzyna Gawlik¹, Danuta Owczarek^{2,3}, Dorota Cibor^{2,3}, Bogdan Solnica¹, Małgorzata Malczewska-Malec¹

¹Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College Kraków, Poland

²Department of Gastroenterology and Hepatology, Jagiellonian University Medical College Kraków, Poland

³Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Krakow, Poland

Submitted: 30 June 2022; Accepted: 6 August 2022

Online publication: 11 August 2022

Arch Med Sci

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>

Copyright © 2022 Termedia & Banach

Corresponding author:

Krystyna Słowińska-Solnica
MSc

Department of Clinical

Biochemistry

Jagiellonian University

Medical College

8 Skawinska St.

31-066 Krakow, Poland

Phone: +4812 4332865

E-mail: krystyna.slowinska-solnica@uj.edu.pl

Abstract

Introduction: We evaluated the diagnostic characteristics of interleukin (IL)-12, interferon (IFN)- γ , IL-10 and IL-19 in the diagnosis and assessment of Crohn's disease (CD) activity.

Material and methods: We studied 49 CD patients assigned to the active (33 patients) and inactive (16 patients) disease subgroups and 31 healthy controls. Serum cytokines were measured using ELISA. Cytokine levels and their multiplication results were compared between the groups and their diagnostic characteristics were assessed.

Results: The levels of the studied cytokines except IL-10 and their multiplication results were significantly higher in CD patients than in controls ($p < 0.0001$ – 0.007) and in patients with active than inactive disease ($p < 0.0001$ – 0.023). In the diagnosis of CD, the [CRP] x [IL-19] and [IL-6] x [IFN- γ] results had a specificity of 0.96, positive predictive value (PPV) of 0.97 and positive likelihood ratio (LR+) of 15.0 and 15.5, respectively, while serum IL-19 and the [IL-6] x [IL-12] and IFN- γ x [IL-12] results had a sensitivity of 0.9–0.96, negative PV (NPV) of 0.75–0.86 and negative LR (LR-) of 0.09–0.18. The area under the ROC curve (AUC) for these markers was 0.776–0.807. In the diagnosis of active CD, the [CRP] x [IL-10] and [CRP] x [IL-19] results had a specificity of 0.98, PPV of 0.96, LR+ of 33.4 and 30.5, and AUC of 0.896 and 0.895, respectively. Serum IFN- γ and the [CRP] x [IFN- γ], [CRP] x [IL-12] and [IFN- γ] x [IL-19] results had diagnostic sensitivity of 0.77–0.94, NPV of 0.86–0.93, LR- of 0.11–0.24 and AUC of 0.781–0.904.

Conclusions: Serum IFN- γ , IL-19 and some of the results of the studied cytokine levels' multiplication showed promising diagnostic performance in the diagnosis of CD and its active form, which requires further validation.

Key words: Crohn's Disease Activity Index, diagnostic characteristics, inflammation, interleukins.

Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are inflammatory bowel diseases (IBD). CD is a transmural inflammation that can affect any part of the gastrointestinal tract, with a chronic relapsing clinical course,

risk of complications and deterioration of quality of patients' life [1, 2]. Although the pathogenesis of the disease is not fully explained, its important element is the dysfunction of the mucosal immune system caused by immunological and genetic factors, including mutations of the *NOD2* and *CARD15* genes, and changes in the intestinal microbiota [1, 2].

The inflammatory process involved in CD is characterized by unbalanced activity of Th1 and Th17 cells with increased production of many pro-inflammatory cytokines including interferon gamma (IFN- γ), interleukin 17A (IL-17A), IL-17F, IL-23 and IL-12. Activity of regulatory T cells (Treg) is decreased with a reduction in the production of anti-inflammatory mediators [2, 3].

IFN- γ is one of the key pro-inflammatory cytokines involved in the pathogenesis of CD, exerting immunomodulatory and endothelial effects. It inhibits the activity of Th2 cells, leading to a reduction of the epithelial barrier function and disruption of the vascular barrier [3–5]. IL-12 induces the Th1 polarization and the secretion of IFN- γ , tumor necrosis factor α (TNF- α) and other mediators active in mucosal inflammation. Additionally, IL-12 works with IL-23 to promote the differentiation of Th17 cells [6].

IL-10 is a key anti-inflammatory cytokine influencing the production of pro-inflammatory mediators and other functions of many immunocompetent cells. Defects in IL-10 signaling have been reported to be associated with IBD, especially in children [7]. IL-19 has been found to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages, Th1 and Th2 cells and has been suggested to have an anti-inflammatory effect in colitis [8].

There is no gold standard in CD diagnosis. This disease is diagnosed on the basis of the clinical presentation, endoscopy with histology, imaging studies including computed tomography and magnetic resonance and laboratory tests [1, 9]. Clinical activity of the disease is assessed using the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and imaging studies. Laboratory tests performed for CD diagnosis include nonspecific inflammatory markers such as erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum C-reactive protein (CRP), and fecal calprotectin [9], and antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* to differentiate CD from UC.

Although the role of many cytokines in the pathogenesis and clinical course of CD is widely researched and well explained, they are not used for diagnostic purposes. Their possible use as markers in the diagnosis of CD must be preceded by an assessment of diagnostic performance. While there is ample evidence about the cytokine networks and serum level profiles in IBD, data on their diagnostic characteristics are scarce.

In our previous paper, we reported an evaluation of the diagnostic performance of serum CRP, IL-6, IL-17A, and IL-23 levels, and their multiplication results in the diagnosis of CD and the assessment of its activity. We found that IL-23 may be a promising candidate marker in the diagnosis of CD, and CRP may be useful in the assessment of disease activity [10]. Continuing this research in the current study, we looked at the diagnostic characteristics of selected pro- and anti-inflammatory cytokines, including IL-12, IFN- γ , IL-10 and IL-19, in the diagnosis and assessment of CD activity.

Material and methods

The study included 49 Caucasian patients with CD, female/male 25/24, aged 36 \pm 14 years, and 31 healthy controls, also Caucasian, female/male 17/14, aged 52 \pm 16 years. The patients were diagnosed and treated in the Department of Gastroenterology and Hepatology of the University Hospital, Krakow, Poland. The diagnosis of CD was established by an experienced physician based on the clinical picture and colonoscopy with histology. CD patients were treated at the time of enrollment with glucocorticoids, 6-mercaptopurine, 5-aminosalicylate, infliximab and antibiotics in various combinations. CD patients with coexisting malignancy, endocrine disorders, diabetes, obesity, ischemic heart disease or systemic diseases were not enrolled in the study. In all CD patients the CDAI score was calculated, and they were assigned to the active (exacerbation, CDAI score \geq 150, 33 patients) and inactive (CDAI score $<$ 150, 16 patients) disease subgroups. The control group consisted of healthy subjects aged 20 to 61 years. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Signed informed consent was obtained from each subject prior to enrolling in the study. The Bioethical Commission of the Jagiellonian University, Krakow, Poland approved the study.

Laboratory tests

The serum was obtained from venous blood samples collected using S-Monovette tubes (Sarstedt, Germany). After clotting and centrifugation, the serum was aliquoted, and samples were stored at -70 $^{\circ}$ C until assayed.

In our previous paper [10], we focused on the diagnostic performance of pro-inflammatory cytokines and CRP, while in this study we aimed to assess the diagnostic characteristics of pro- and anti-inflammatory cytokines involved in the pathogenesis and course of CD. Serum concentrations of IL-6 and CRP were determined using ELISA and immunonephelometry, respectively, as

described elsewhere [10]. Serum levels of IL-12, IFN- γ , IL-10 and IL-19 were measured using the following ELISA reagents: Human IL12 (Interleukin 12) ELISA Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), reportable range 3.13–200 pg/ml; Human IFN-gamma ELISA, High Sensitivity (BioVendor, Brno, Czech Republic), reportable range 0.8–25.0 pg/ml; Human IL-10 High Sensitivity ELISA Kit (Diaclone SAS, Cedex, France), reportable range 1.0–50.0 pg/ml and Human IL19 (Interleukin 19) ELISA Kit (Elabscience Houston, USA), reportable range 31.25–2,000 pg/ml. All measurements were performed using the ELx808 spectrophotometer (BioTek R Instruments, Inc., Winooski, USA).

Multiplication results of [IL-6] x [IL-10], [IL-6] x [IL-19], [IL-6] x [IFN- γ], [CRP] x [IL-10], [CRP] x [IL-19], [CRP] x [IFN- γ], [IL-10] x [IL-19], [IL-10] x [IFN- γ], and [IL-19] x [IFN- γ], were calculated using standard concentration units, i.e. mg/l for CRP and pg/ml for interleukins. Serum levels of CRP and IL-6, analyzed elsewhere [10], were used only for these calculations.

Statistical analysis

All variables in the present study, except serum IL-10, showed in the Shapiro-Wilk test a non-Gaussian distribution, so the results are presented as medians and interquartile ranges (IQR, Q1–Q3). Medians were compared using the Kruskal-Wallis ANOVA test and the Dunn test.

Spearman's rank coefficient (R) was used to assess the correlation. $P < 0.05$ was applied as the significance level.

Diagnostic characteristics in the diagnosis/exclusion of CD and active disease were assessed for serum IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-19 levels, and their multiplication results. Relevant cut-off values were established based on the ROC (receiver operating characteristics) curve analysis, and diagnostic sensitivity and specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV), positive and negative likelihood ratios (LR+, LR-) and area under ROC curves (AUC) were calculated.

All statistical analyses were performed using the Statistica 13 software (TIBCO Software, Palo Alto CA, USA).

Results

Diagnosis/exclusion of Crohn's disease

Serum IL-12, IFN- γ and IL-19 levels were significantly higher in CD patients than in the control group ($p < 0.0001$ – 0.007). All multiplication results also differed significantly between CD patients and controls ($p < 0.0001$ – 0.017) (Table I).

In the diagnosis of CD, the [CRP] x [IL-19] and [IL-6] x [IFN- γ] results had diagnostic specificity of 0.96, PPV of 0.97 and LR+ of 15.0 and 15.5, respectively, while serum IL-19 and the [IL-6] x [IL-12] and IFN- γ x [IL-12] results had diagnostic sensitivity of 0.9–0.96, NPV of 0.75–0.86 and LR- of 0.09–0.18. The AUC of these markers ranged

Table I. Comparison of median (mean for IL-10) concentration of studied cytokines in the serum and the multiplication results in patients with Crohn's disease (CD) and in the control group

| Variables | Control group, $n = 31$ | CD, $n = 49$ | P -value |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|------------|
| IL-10 [pg/ml] | 5.0 \pm 2.2 | 6.1 \pm 2.3 | 0.0357 |
| IL-12 [pg/ml] | 2.3 (1.5–4.5) | 5.1 (2.8–8.3) | 0.0027 |
| IL-19 [pg/ml] | 22.9 (17.0–39.5) | 61.4 (35.7–134.0) | < 0.0001 |
| IFN- γ [pg/ml] | 2.9 (1.9–6.1) | 6.6 (4.7–10.4) | 0.0006 |
| [CRP] x [IFN- γ] | 2.8 (0.4–9.2) | 37.6 (4.8–148.3) | < 0.0001 |
| [CRP] x [IL-10] | 4.4 (0.8–11.0) | 26.2 (5.5–125.6) | 0.0001 |
| [CRP] x [IL-12] | 2.0 (0.5–4.7) | 18.0 (3.8–110.9) | < 0.0001 |
| [CRP] x [IL-19] | 26.3 (4.1–72.1) | 465.6 (30.6–1555.0) | 0.0007 |
| [IL-6] x [IL-10] | 6.9 (3.2–9.9) | 20.2 (8.3–47.8) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IL-12] | 2.8 (1.9–6.8) | 17.4 (4.6–51.8) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IL-19] | 36.4 (20.6–68.4) | 283.3 (68.5–686.4) | 0.0070 |
| [IL-6] x [IFN- γ] | 5.0 (2.2–9.5) | 24.1 (7.0–68.6) | < 0.0001 |
| [IFN- γ] x [IL-10] | 12.9 (9.5–33.56) | 41.3 (19.6–79.2) | 0.0003 |
| [IFN- γ] x [IL-12] | 7.8 (3.8–16.2) | 34.3 (12.4–76.7) | < 0.0001 |
| [IFN- γ] x [IL-19] | 104.9 (44.7–169.9) | 421.2 (228.4–1030.5) | 0.0006 |
| [IL-10] x [IL-12] | 11.0 (5.3–26.7) | 31.8 (12.2–64.9) | 0.0017 |
| [IL-10] x [IL-19] | 135.3 (57.4–319.6) | 378.5(177.2–785.5) | < 0.0001 |
| [IL-12] x [IL-19] | 57.6 (29.3–294.6) | 354.3 (120.3–795.5) | < 0.0001 |

Table II. Comparison of diagnostic characteristics of the studied cytokines and the multiplication results in the diagnosis of Crohn's disease

| Variables | Cut-off value | AUC | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV | LR+ | LR- |
|----------------------------|---------------|-------|-------------|-------------|------|------|------|------|
| IL-10 [pg/ml] | 3.86 | 0.640 | 0.85 | 0.36 | 0.69 | 0.59 | 1.33 | 0.42 |
| IL-12 [pg/ml] | 1.76 | 0.708 | 0.90 | 0.43 | 0.73 | 0.71 | 1.58 | 0.23 |
| IL-19 [pg/ml] | 22.07 | 0.776 | 0.96 | 0.43 | 0.74 | 0.86 | 1.68 | 0.09 |
| IFN- γ [pg/ml] | 3.55 | 0.738 | 0.87 | 0.57 | 0.78 | 0.73 | 2.02 | 0.23 |
| [CRP] x [IFN- γ] | 12.34 | 0.793 | 0.69 | 0.89 | 0.92 | 0.62 | 6.20 | 0.35 |
| [CRP] x [IL-10] | 1.33 | 0.767 | 0.90 | 0.43 | 0.73 | 0.71 | 1.58 | 0.23 |
| [CRP] x [IL-12] | 4.23 | 0.797 | 0.75 | 0.75 | 0.84 | 0.64 | 3.00 | 0.33 |
| [CRP] x [IL-19] | 98.25 | 0.807 | 0.60 | 0.96 | 0.97 | 0.59 | 15.0 | 0.42 |
| [IL-6] x [IL-10] | 10.00 | 0.768 | 0.73 | 0.79 | 0.85 | 0.63 | 3.48 | 0.34 |
| [IL-6] x [IL-12] | 3.02 | 0.786 | 0.9 | 0.57 | 0.78 | 0.76 | 2.09 | 0.17 |
| [IL-6] x [IL-19] | 52.91 | 0.824 | 0.81 | 0.71 | 0.83 | 0.70 | 2.79 | 0.39 |
| [IL-6] x [IFN- γ] | 18.42 | 0.798 | 0.62 | 0.96 | 0.97 | 0.60 | 15.5 | 0.39 |
| [IFN- γ] x [IL-10] | 15.04 | 0.749 | 0.85 | 0.57 | 0.77 | 0.70 | 1.98 | 0.26 |
| [IFN- γ] x [IL-12] | 8.43 | 0.785 | 0.90 | 0.54 | 0.77 | 0.75 | 1.96 | 0.18 |
| [IFN- γ] x [IL-19] | 197.01 | 0.808 | 0.79 | 0.78 | 0.86 | 0.69 | 3.17 | 0.29 |
| [IL-10] x [IL-12] | 10.29 | 0.717 | 0.87 | 0.50 | 0.75 | 0.70 | 1.74 | 0.26 |
| [IL-10] x [IL-19] | 169.49 | 0.767 | 0.83 | 0.64 | 0.80 | 0.69 | 2.33 | 0.26 |
| [IL-12] x [IL-19] | 90.79 | 0.781 | 0.94 | 0.68 | 0.83 | 0.86 | 2.92 | 0.09 |

AUC – area under the ROC curve, PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, LR+ – positive likelihood ratio [sensitivity/(1-specificity)], LR- – negative likelihood ratio [(1-sensitivity)/specificity]

Table III. Comparison of median (mean for IL-10) concentration of studied cytokines in the serum and the multiplication results in patients with inactive Crohn's disease (CD), active CD and in the control group

| Variables | Control group, n = 31 | Inactive CD, n = 16 | Active CD, n = 33 | P-value |
|----------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| IL-10 [pg/ml] | 5.0 \pm 2.2 | 5.3 \pm 2.3 | 6.6 \pm 2.2 | 0.0226 |
| IL-12 [pg/ml] | 2.3 (1.5–4.5) | 3.4 (2.3–6.8) | 5.1 (3.9–9.2) | 0.0043 |
| IL-19 [pg/ml] | 22.9 (17.0–39.5) | 50.2 (27.3–167.9) | 73.0 (36.6–122.2) | 0.0003 |
| IFN- γ [pg/ml] | 2.9 (1.9–6.1) | 3.8 (2.6–7.0) | 7.1 (5.3–11.1) | 0.0001 |
| [CRP] x [IFN- γ] | 2.8 (0.4–9.2) | 4.8 (0.7–12.6) | 88.8 (27.5–322.4) | < 0.0001 |
| [CRP] x [IL-10] | 4.4 (0.8–11.0) | 3.5 (1.7–17.3) | 73.4 (20.4–174.5) | < 0.0001 |
| [CRP] x [IL-12] | 2.0 (0.5–4.7) | 3.3 (0.9–6.6) | 77.2 (15.5–204.7) | < 0.0001 |
| [CRP] x [IL-19] | 26.3 (4.1–72.1) | 22.1 (12.3–309.0) | 1256.0 (209.6–1865.7) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IL-10] | 6.9 (3.2–9.9) | 10.0 (3.7–18.9) | 31.9 (13.3–59.5) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IL-12] | 2.8 (1.9–6.8) | 6.5 (3.0–15.1) | 26.4 (11.0–97.9) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IL-19] | 36.4 (0.2–3.3) | 73.0 (41.9–309.6) | 353.0 (145.6–783.2) | < 0.0001 |
| [IL-6] x [IFN- γ] | 5.0 (2.2–9.5) | 8.2 (2.5–18.4) | 29.3 (22.3–117.7) | < 0.0001 |
| [IFN- γ] x [IL-10] | 12.9 (9.5–33.56) | 17.7 (10.5–53.8) | 44.2 (27.3–92.8) | 0.0001 |
| [IFN- γ] x [IL-12] | 7.8 (3.8–16.2) | 15.2 (8.6–44.5) | 43.8 (22.8–89.2) | < 0.0001 |
| [IFN- γ] x [IL-19] | 104.9 (44.7–169.9) | 344.3 (70.3–941.1) | 584.6 (241.3–1105.2) | < 0.0001 |
| [IL-10] x [IL-12] | 11.0 (5.3–26.7) | 15.5 (11.4–43.2) | 35.4 (17.4–70.0) | 0.0024 |
| [IL-10] x [IL-19] | 135.3 (57.4–319.6) | 299.6 (122.4–721.5) | 381.4 (186.0–862.6) | 0.0003 |
| [IL-12] x [IL-19] | 57.6 (29.3–294.6) | 255.0 (102.6–398.0) | 370.6 (125.7–834.9) | 0.0001 |

from 0.776 to 0.807 (Table II). The diagnostic characteristics of the remaining cytokines and the multiplication results in the diagnosis/exclusion of CD were poor.

Diagnosis/exclusion of active Crohn's disease

The serum concentrations of the studied cytokines and all their multiplication results were significantly higher in CD patients with active than inactive disease and in patients with inactive disease than in the controls ($p < 0.0001-0.023$) (Table III). However, only serum IL-12 and IFN- γ significantly correlated ($p < 0.05$) with the CDAI scores (Fig. 1).

In the diagnosis of active CD, the [CRP] x [IL-10] and [CRP] x [IL-19] results had a specificity of 0.98, PPV 0.96, LR+ 33.4 and 30.5, and AUC 0.896 and 0.895, respectively. Serum IFN- γ and the [CRP] x [IFN- γ], [CRP] x [IL-12] and [IFN- γ] x [IL-19] results had diagnostic sensitivity of 0.77-0.94, NPV 0.86-0.93, LR- 0.11-0.24 and AUC 0.781-0.904 (Table IV).

The remaining cytokines and multiplication results performed poorly in differentiating active and inactive CD.

Discussion

CD is an immune-mediated intestinal inflammation driven by activation of Th1 and Th17 cells with increased secretion of their cytokines like IL-12, IL-23, IL-17 and IFN- γ [1, 2], and disease activity is actually the degree of inflammation. Although there is a growing body of evidence of cytokine networks in IBD, the use of these mediators for diagnostic purposes is very limited. The 2016 European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) Consensus recommends checking for chronic inflammatory response with serum CRP, ESR and fecal calprotectin in the diagnosis of CD [9]. Among them, only fecal calprotectin is specifically associated with intestinal inflammation.

There are many cytokines involved in the pathogenesis of CD, but data on their performance in the diagnosis of this disease are scarce. Therefore, the assumption of our study evaluating the diagnostic characteristics of IL-12, IFN- γ , IL-10 and IL-19 was the possibility of using inflammatory mediators involved in the CD pathogenesis as disease markers.

IL-12 is, along with other members of the IL-12 family (IL-2, IL-23, IL-27, IL-35), one of the

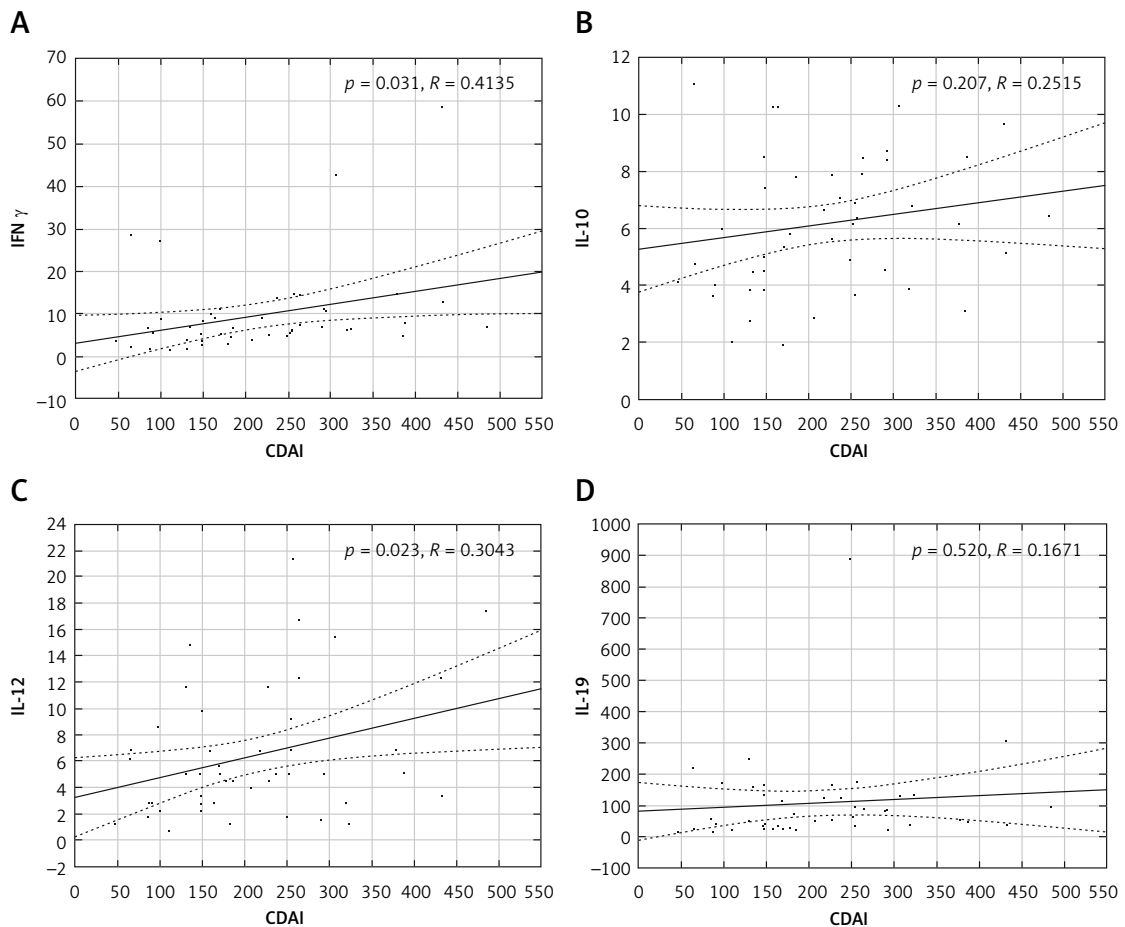


Figure 1. Spearman's correlation between serum levels of studied cytokines and CDAI scores

Table IV. Comparison of diagnostic characteristics of the studied cytokines and the multiplication results in the diagnosis of active Crohn's disease

| Variables | Cut-off value | AUC | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV | LR+ | LR- |
|----------------------------|---------------|-------|-------------|-------------|------|------|-------|------|
| IL-10 [pg/ml] | 5.64 | 0.685 | 0.71 | 0.64 | 0.57 | 0.76 | 2.00 | 0.45 |
| IL-12 [pg/ml] | 4.50 | 0.700 | 0.74 | 0.64 | 0.59 | 0.78 | 2.09 | 0.40 |
| IL-19 [pg/ml] | 52.23 | 0.705 | 0.68 | 0.69 | 0.60 | 0.76 | 2.18 | 0.44 |
| IFN- γ [pg/ml] | 4.54 | 0.784 | 0.94 | 0.60 | 0.62 | 0.93 | 2.34 | 0.11 |
| [CRP] x [IFN- γ] | 27.45 | 0.904 | 0.77 | 0.96 | 0.92 | 0.86 | 17.42 | 0.24 |
| [CRP] x [IL-10] | 31.96 | 0.896 | 0.74 | 0.98 | 0.96 | 0.85 | 33.4 | 0.26 |
| [CRP] x [IL-12] | 12.13 | 0.899 | 0.84 | 0.89 | 0.84 | 0.89 | 7.55 | 0.18 |
| [CRP] x [IL-19] | 638.80 | 0.895 | 0.68 | 0.98 | 0.96 | 0.82 | 30.48 | 0.33 |
| [IL-6] x [IFN- γ] | 21.91 | 0.852 | 0.81 | 0.91 | 0.86 | 0.87 | 9.07 | 0.21 |
| [IL-6] x [IL-10] | 21.53 | 0.816 | 0.64 | 0.87 | 0.77 | 0.78 | 4.92 | 0.41 |
| [IL-6] x [IL-12] | 21.76 | 0.817 | 0.61 | 0.89 | 0.79 | 0.77 | 5.51 | 0.44 |
| [IL-6] x [IL-19] | 251.94 | 0.817 | 0.74 | 0.84 | 0.77 | 0.83 | 4.62 | 0.31 |
| [IFN- γ] x [IL-10] | 22.07 | 0.790 | 0.87 | 0.64 | 0.63 | 0.88 | 2.45 | 0.20 |
| [IFN- γ] x [IL-12] | 22.80 | 0.787 | 0.74 | 0.78 | 0.71 | 0.83 | 3.48 | 0.29 |
| [IFN- γ] x [IL-19] | 197.01 | 0.781 | 0.90 | 0.64 | 0.64 | 0.91 | 2.54 | 0.15 |
| [IL-10] x [IL-12] | 24.96 | 0.713 | 0.74 | 0.69 | 0.62 | 0.80 | 2.39 | 0.38 |
| [IL-10] x [IL-19] | 746.00 | 0.723 | 0.36 | 0.89 | 0.69 | 0.67 | 3.19 | 0.73 |
| [IL-12] x [IL-19] | 108.90 | 0.736 | 0.90 | 0.56 | 0.58 | 0.89 | 2.03 | 0.17 |

AUC – area under the ROC curve; PPV – positive predictive value; NPV – predictive value; LR+ – positive likelihood ratio [sensitivity/(1-specificity)]; LR- – negative likelihood ratio [(1-sensitivity)/specificity]

key mediators of the inflammatory response. IL-12 and IL-23, sharing the p40 subunit, cooperate in a common pathway with IL-23 dominance and play a pivotal role in the induction of mucosal inflammation in the pathogenesis of CD [6, 11, 12]. Increased expression in intestinal samples and higher serum levels of both IL-12 and IL-23 in CD patients have been reported [10, 13], but also no differences in serum IL-12 between CD patients and controls were found [14]. Previously, we found increased serum levels and very good diagnostic performance of serum IL-23 in the diagnosis of CD [10]. In the present study, serum IL-12 and its multiplication results were significantly higher in CD patients than in controls, and in CD patients with active disease (Table I and II). Additionally, serum IL-12 correlated with the CDAI scores (Fig. 1). However, serum IL-12 performed poorly in the diagnosis of CD, but when multiplied by serum levels of IL-6 and IFN- γ , these combined markers performed well in excluding CD (Table II). Serum IL-12 turned out to be useless in the diagnosis of active CD, and only the [CRP] x [IL-12] results performed better (Table IV). These differences in diagnostic characteristics between IL-23 [10] and IL-12 may reflect the predominance of IL-23 in their common pathway.

IFN- γ is another key pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of CD. It activates macrophages and lymphocytes, and its additional

role is disruption of the vascular barrier and reduction of the epithelial barrier function [2, 5, 15].

Higher serum IFN- γ levels in CD patients than in healthy subjects have been reported in many studies [16–19]. However, IFN- γ is not used as an inflammatory marker in the diagnosis of CD. Measurement of IFN- γ is only for differentiating between CD and intestinal tuberculosis (ITB). T-cell based IFN- γ release assays (IGRAs) provide good diagnostic performance for an accurate diagnosis of ITB [20]. Recently it was reported that serum IFN- γ in combination with IL-6 and fecal calprotectin constituted an index that six months after ileocolonic resection for CD had the AUC of 0.90 to predict an early recurrence [21].

In the present study, serum IFN- γ as well as its multiplication results were also significantly higher in CD patients than in controls, and in CD patients with active disease, correlating with CDAI scores (Table I and III, Fig. 1). Not serum IFN- γ but the [IL-6] x [IFN- γ] results performed well in diagnosing CD, and [IFN- γ] x [IL-12] results performed well in excluding CD (Table II). Serum IFN- γ and its multiplication by CRP and IL-19 levels performed well in the exclusion of active CD. The AUC > 0.7 also indicated good diagnostic performance of these combined markers (Table IV) [22].

IL-10 as negative regulatory mediator is involved in reducing the effects of T lymphocytes in the intestinal mucosa [23–25]. It is suggested

that Th1 and Th17 cells self-limit their inflammatory activity via IL-10 expression [26]. Mutations in IL-10 or its receptor genes have been reported to increase susceptibility to IBD [7, 27].

Elevated IL-10 mRNA expression in the intestinal mucosa was found in patients with both UC and CD [28, 29]. In patients with CD [30, 31] and with active disease [32] higher serum levels of IL-10 than in controls were found. Mitsuyama *et al.* found elevated serum IL-10 levels during recovery in IBD patients and suggested its use in monitoring disease status [33]. In other studies, serum IL-10 levels in patients with CD did not differ significantly from the controls [14, 34].

In the present study, serum anti-inflammatory IL-10 and its multiplication results were also significantly higher in CD patients than in controls and in CD patients with active disease (Table I and III).

Only one combined marker, [CRP] x [IL-10], performed very well in the diagnosis of active CD with diagnostic specificity and PPV close to 1.0, LR+ above 30 and AUC > 0.8 (Table IV).

IL-19, belonging to the IL-10 superfamily, functions as an immunomodulatory cytokine [35, 36]. The role of IL-19 in IBD is not fully elucidated and data from in vitro, animal, and human studies are inconsistent. Fujimoto *et al.* described the possible anti-inflammatory effects of IL-19 in colitis [8]. Defects in IL-19 expression and an impaired response to this cytokine have been reported to possibly contribute to inflammation in active CD [36]. Fonseca-Camarillo *et al.* found elevated IL-19 and IL-24 gene expression and increased numbers of IL-19- and IL-24-producing cells in patients with active CD compared to healthy controls [37]. Increased IL-19 expression in biopsy specimens and elevated blood levels have been found in patients with active IBD [38].

We also found significantly higher serum IL-19 in CD patients compared to controls and in patients with active CD (Table I and III). Serum IL-19 performed well in the exclusion of CD (Table II). On the other hand, the [CRP] x [IL-19] results performed well in the diagnosis of CD (Table II) and, with a different cut-off value, in the diagnosis of active CD with the same diagnostic characteristics as [CRP] x [IL-10] (Table IV).

In summary, serum levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines studied were significantly higher in CD patients and in patients with active disease although all patients with CD were receiving anti-inflammatory therapy at the time of enrollment and blood collection. These findings may reflect the widely studied and reported co-occurrence of pro- and anti-inflammatory processes in IBD [39–41]. However, only the serum levels of pro-inflammatory cytokines, IFN- γ and IL-12, significantly correlated with CDAI scores, thus reflecting disease activity (Fig. 1).

Among the studied cytokines, only IFN- γ and IL-19 showed promising diagnostic characteristics as single markers. Combined markers including [IL-6] x [IFN- γ], [IL-6] x [IL-12], and IFN- γ x [IL-12] performed well in the diagnosis of CD, and [CRP] x [IL-10], [CRP] x [IFN- γ], [CRP] x [IL-12] and [IFN- γ] x [IL-19] performed well in the diagnosis of active disease. The [CRP] x [IL-19] results turned out to be useful in the diagnosis of both CD and its active form (Table III and IV). Of note, three of the five combined markers that performed well in the diagnosis of active CD are the results of multiplying the levels of pro- and anti-inflammatory markers.

These findings suggest considering the use of combined inflammatory markers in these settings, as reported by Cerrillo *et al.* and Kiernan *et al.* [21, 31]. Billiet *et al.* found that the ratio of TNF- α /CRP may predict non-response to treatment with infliximab [42]. The search for markers for CD diagnostics continues and goes beyond inflammatory cytokines. Recently, Wędrychowicz *et al.* found that plasma antimicrobial peptides (elafin, cathelicidin, α -defensins) are associated with the phenotype and location of CD lesions in children [43]. Overall, the analysis of the immune response cannot be overestimated in clinical practice, as demonstrated in the LATE-COVID-Kids Study of the pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2 (PIMS-TS) [44].

Completing the CDAI is time-consuming, requires prior complete blood count (CBC) checks, and sometimes requires additional consultations, e.g. by an ophthalmologist. Part of the patient's response is subjective, which should also be considered a limitation. Regardless of this, we used CDAI as a reference in the assessment of the diagnostic characteristics of the cytokines studied to check the agreement between these tools. For CD monitoring purposes also endoscopy including small-bowel capsule endoscopy and cross-sectional imaging studies utilizing ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance are in use [45]. However, these diagnostic tools are resource dependent, not widely available, and have some limitations.

In patients with CD, laboratory tests such as CBC are routinely performed at control visits, so more tests may be ordered. We found that serum IFN- γ , IL-19 and results of multiplication of studied cytokine levels as combined markers can effectively preclude or confirm CD and its active form. Markers with such diagnostic characteristics could be considered a complementary tool and later possibly an alternative to CDAI in the assessment of CD activity.

The important point is that currently all cytokine assays used in our study are approved for research use only. Possible adoption of them as

candidate and later recommended markers would require appropriate analytical standardization in accordance with the regulations in laboratory diagnostics. On the other hand, serum CRP and IL-6 measurements are routinely available. It should also be taken into account that the use of combined markers would complicate the diagnostic process and increase its costs.

Due to the small size of the studied groups, our results should be considered preliminary, requiring verification.

Conclusions

This is our latest study evaluating the possibility of extending the panel of inflammatory markers used in CD diagnosis and assessment of its activity. It could make the clinical CD workup faster and more convenient for the patient, easier and cheaper. Our results suggest the need for further evaluation of IFN- γ , IL-19 and selected combined markers, including correlation with the CDAI scores and results of imaging studies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 1088-103.
2. Zhang Y, Li Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 91-9.
3. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-8.
4. Cuia D, Huanga, G, Yanga D, et al. Efficacy and safety of interferon-gamma-targeted therapy in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37: 507-13.
5. Langer V, Vivi E, Regensburger D, et al. IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VEcadherin-directed vascular barrier disruption. *J Clin Invest* 2019; 129: 4691-707.
6. Aggeletopoulou I, Assimakopoulos SF, Konstantakis C, et al. Interleukin 12/interleukin 23 pathway: Biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 4093-103.
7. Krawiec P, Pawłowska-Kamieniak A, Pac-Kożuchowska E. Interleukin 10 and interleukin 10 receptor in paediatric inflammatory bowel disease: from bench to bedside lesson. *J Inflamm* 2021; 18: 13.
8. Fujimoto Y, Aono K, Azuma YT. The clarified role of interleukin-19 in the inflammatory bowel disease and hypersensitivity: insights from animal models and humans. *J Vet Med Sci* 2019; 81: 1067-73.
9. Gomollón F, Dignass A, Annese V, et al. on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohn's Colitis* 2017; 3-25.
10. Slowinska-Solnica K, Pawlica-Gosiewska D, Gawlik K, et al. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity. *Arch Med Sci* 2021; 17: 252-7.
11. Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: Pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5606-10.
12. Arnold Greving CN, Towne JE. A role for IL-12 in IBD after all? *Immunity* 2019; 51: 209-11.
13. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; 150: 823-32.
14. Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Rocha-Pizaña MR, et al. Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. *Medicine* 2019; 98: 38: e17208.
15. Strober W, Fuss IJ. Pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of IBD. *Gastroenterology* 2011; 140: 1756-67.
16. Singh UP, Singh NP, Murphy EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 2016; 77: 44-9.
17. Korolkova OY, Myers JM, Pellom ST, et al. Characterization of serum cytokine profile in predominantly colonic inflammatory bowel disease to delineate ulcerative and Crohn's colitides. *Gastroenterology* 2015; 8: 29-44.
18. Vasilyeva E, Abdulkhakov S, Cherepnev G, et al. Serum cytokine profiles in children with Crohn's disease. *Med Inflamm* 2016; 2016: 7420127.
19. Chen P, Zhou G, Lin J, et al. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. *Front Med* 2020; 7: 123.
20. Chen W, Fan JH, Luo W, et al. Effectiveness of interferon-gamma release assays for differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8133-40.
21. Cerrillo E, Moret I, Iborra M, et al. A nomogram combining fecal calprotectin levels and plasma cytokine profiles for individual prediction of postoperative Crohn's disease recurrence. *Inflamm Bowel Dis* 2019; 25: 1681-91.
22. Šimundić AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. *eJIFCC* 2008; 19: 203-11.
23. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, et al. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv Immunol* 2014; 122: 177-210.
24. Castillo P, Kolls JK. IL-10: a paradigm for counterregulatory cytokines. *J Immunol* 2016; 197: 1529-30.
25. Fu SH, Chien MW, Hsu CY, et al. Interplay between cytokine circuitry and transcriptional regulation shaping helper T cell pathogenicity and plasticity in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 3379.
26. Cope A, Le Friec G, Cardone J, et al. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching. *Trends Immunol* 2011; 32: 278-86.
27. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361: 2033-45.
28. Schreiber S, Heinig T, Thiele G, et al. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 10.
29. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 428-35.

30. Meng D, Liang L, Guo X. Serum interleukin-10 level in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Eur J Inflamm* 2019; 17: 1-7.
31. Kiernan MG, Calvin Coffey J, Sahebally SM, et al. Systemic molecular mediators of inflammation differentiate between Crohn's disease and ulcerative colitis, implicating threshold levels of IL-10 and relative ratios of pro-inflammatory cytokines in therapy. *J Crohns Colitis* 2020; 14: 118-129.
32. Kucharzik T, Stoll R, Lügering N, et al. Circulating anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 452-6.
33. Mitsuyama K, Tomiyasu N, Takaki K, et al. Interleukin-10 in the pathophysiology of inflammatory bowel disease: increased serum concentrations during the recovery phase. *Med Inflamm* 2006; 2006: 26875.
34. Nielsen OH, Køppen T, Rüdiger N, et al. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1786-93.
35. Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK. Interleukins involved in inflammatory bowel disease as new therapeutic targets. *Cur Immunol Rev* 2013; 9: 86-92.
36. Cantó E, Garcia Planella E, Zamora-Atenza C, et al. Interleukin-19 impairment in active Crohn's disease patients. *PLoS One* 2014; 9: e93910.
37. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Granados J, et al. Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study. *Clin Exp Immunol* 2014; 177: 64-75.
38. Steinert A, Linas I, Kaya B, et al. The stimulation of macrophages with TLR ligands supports increased IL-19 expression in inflammatory bowel disease patients and in colitis models. *J Immunol* 2017, 199: 2570-84.
39. Chen ML, Sundrud MS. Cytokine networks and T cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 2: 1157-67.
40. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Immunity* 2019; 50: 992-1006.
41. Lee SH, Kwon J, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res* 2018; 16: 2642.
42. Billiet T, Cleynen I, Ballet V, et al. Evolution of cytokines and inflammatory biomarkers during infliximab induction therapy and the impact of inflammatory burden on primary response in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2017; 52: 1086-92.
43. Wędrychowicz A, Tomasik P, Kowalska-Duplaga K, et al. Plasma elafin, cathelicidin, and α -defensins are increased in paediatric inflammatory Crohn's disease and reflect disease location. *Arch Med Sci* 2021; 17: 1114-7.
44. Jatzak-Pawlik I, Lewek J, Czkwianianc E, et al. LATE-COVID-Kids Study. Biochemical and cardiovascular predictors of PIMS-TS risk in children after COVID-19 recovery: preliminary results of the LATE-COVID-Kids Study. *Arch Med Sci* 2022; 18: 545-52.
45. Benitez JM, Meuwis MA, Reenaers C, et al. Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* 2013; 62: 1806-16.

5. Podsumowanie wyników

W przeprowadzonych badaniach stwierdziliśmy, że stężenia CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-19 i IL-23 w surowicy były znacząco większe u pacjentów z ChLC niż w grupie kontrolnej, a stężenia CRP, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 i IL-19 – znacząco większe u pacjentów z aktywną niż nieaktywną postacią choroby oraz w grupie kontrolnej. Stężenia IFN- γ i IL-12 korelowały z wartościami CDAI.

Charakterystyka diagnostyczna IL-23 okazała się najlepsza zarówno w rozpoznawaniu jak i wykluczaniu ChLC (LR+ = 29,9; LR- = 0,04). Porównywalne cechy diagnostyczne stwierdzono dla iloczynów stężeń IL-23 i CRP, IL-6 oraz IL-7A. Ponadto, w rozpoznawaniu ChLC korzystną charakterystyką diagnostyczną cechowały się iloczyny stężeń: [CRP]x[IL-19] i [IL-6]x[IFN- γ], a w wykluczaniu choroby – IL-19 oraz iloczyny: [IL-6]x[IL-12] i IFN- γ x[IL-12]. W rozpoznawaniu aktywnej postaci ChLC obiecującymi markerami okazały się CRP oraz iloczyny: [CRP]x[IL-10] i [CRP]x[IL-19], a w jej wykluczaniu – IFN- γ oraz iloczyny: [CRP]x[IFN- γ], [CRP]x[IL-12] i [IFN- γ]x[IL-19].

Charakterystyka diagnostyczna części wymienionych iloczynów stężeń jako markerów złożonych w rozpoznawaniu ChLC ustępowała charakterystyce wskazanych pojedynczych markerów, natomiast w rozpoznawaniu / wykluczaniu aktywnej choroby była porównywalna lub lepsza. Stężenia IL-6, IL-10, IL-12 i IL-17A jako pojedynczych markerów nie okazały się przydatne w rozpoznawaniu ChLC, ani w ocenie jej aktywności, chociaż wymienione zawierające je markery złożone (iloczyny) miały obiecującą charakterystykę diagnostyczną.

W rozpoznawaniu ChLC nie ma złotego standardu diagnostycznego. Poza obrazem klinicznym, rozpoznanie choroby jest oparte na stwierdzeniu zmian morfologicznych w zajęтым odcinku przewodu pokarmowego (endoskopia z badaniem histologicznym) oraz potwierdzenie występowania stanu zapalnego, również definiującego chorobę. Do tego ostatniego celu rekomendowane są oznaczanie stężenia CRP, odczyn opadania krwinek czerwonych (OB) lub oznaczanie kalprotektyny w kale [1-4,16]. CRP i OB są powszechnie używanymi, czułymi choć mało swoistymi wskaźnikami stanu zapalnego. W naszym badaniu CRP nie okazało się dobrym markerem zapalnym w rozpoznawaniu ChLC, natomiast IL-23, cytokina o dużym znaczeniu dla patogenezy choroby, będąca intensywnie badanym punktem uchwytu leczenia biologicznego w NChZJ [21], miała tu najlepszą charakterystykę diagnostyczną. W przypadku potwierdzenia jej w dalszych badaniach, IL-23 mogłaby być silnym kandydatem do uzupełnienia listy markerów zapalnych używanych w diagnostyce ChLC, a nawet do zastąpienia w niej CRP i OB jako bardziej swoisty marker.

W ocenie aktywności ChLC nie stosuje się rutynowo oznaczeń markerów zapalnych, chociaż zwiększenie aktywności choroby można uznać za tożsame z nasileniem stanu zapalnego. Rekomendowanym i powszechnie stosowanym narzędziem diagnostycznym w monitorowaniu przebiegu ChLC jest CDAI – skala punktowa, w której pytania są zorientowane głównie na stan zapalny, ale jedynym wskaźnikiem laboratoryjnym jest w niej hematokryt [22].

W naszym materiale z wartościami CDAI korelowały stężenia części cytokin prozapalnych, IFN- γ i IL-12. Korzystną charakterystykę diagnostyczną w rozpoznawaniu aktywnej postaci ChLC stwierdziliśmy dla CRP oraz iloczynów jego stężeń i stężeń cytokin o działaniu

przeciwzapalnym, IL-10 i IL-19, a w wykluczaniu aktywnej choroby – dla IFN- γ oraz iloczynów jego stężeń.

Wypełnianie formularza CDAI jest czasochłonne, może wymagać procedur diagnostycznych i konsultacji (np. okulistycznej), a część odpowiedzi pacjenta ma charakter subiektywny. Do oceny aktywności ChLC może służyć również endoskopia (w tym kapsułkowa) oraz tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny [23]. Niezależnie od ekspozycji na promienie Rentgena w tomografii komputerowej [24], dostęp do tych badań jest jednak ograniczony, ponadto generują one duże koszty.

Można przypuszczać, że uzupełnienie CDAI o oznaczenia CRP oraz IFN- γ , jako markerów potwierdzających / wykluczających aktywną postać ChLC, byłoby pomocne w bieżącej ocenie przebiegu choroby. Kontynuacja badań nad takim wykorzystaniem CRP i IFN- γ może dostarczyć danych uzasadniających nawet zastąpienie CDAI biochemicznymi wskaźnikami stanu zapalnego, co pozwoliłoby na znaczne uproszczenie monitorowania przebiegu choroby. Wobec małej liczebności badanych grup pacjentów z ChLC uzyskane wyniki należy uznać za wstępne, ale kierunek badań za warty kontynuacji. Przedstawiona w niniejszej pracy charakterystyka diagnostyczna wybranych markerów / mediatorów stanu zapalnego wymaga weryfikacji przez zestawienie jej z danymi klinicznymi i wynikami badań obrazowych u pacjentów z ChLC.

Należy także zaznaczyć, że spośród badanych markerów-kandydatów obecnie jedynie stężenia CRP i IL-6 w surowicy są rutynowo oznaczane w laboratoriach diagnostycznych. Oznaczenia (zestawy odczynników) IL-19, IL-23 i IFN- γ oraz pozostałych badanych cytokin są dopuszczone jedynie do celów naukowych. Oznaczenia te są wykonywane przy pomocy pracochłonnej metody ELISA, nie są dla nich dostępne aplikacje na automatyczne analizatory biochemiczne. Stanowi to również ograniczenie dla złożonych markerów (iloczynów stężeń) zawierających IL-10 i IL-12, dla których wykazaliśmy korzystną charakterystykę diagnostyczną w rozpoznawaniu / wykluczaniu aktywnej ChLC. Potwierdzenie w dalszych badaniach przydatności IL-19, IL-23 i IFN- γ w diagnostyce ChLC, przed ewentualnym rekomendowaniem i wdrożeniem ich do praktyki klinicznej, będzie wymagało standaryzacji i procedur kontroli jakości tych oznaczeń zgodnie z regułami medycyny laboratoryjnej oraz ich automatyzacji.

6. Wnioski

- 1) Stężenie CRP i wszystkich badanych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w surowicy było większe u pacjentów z ChLC niż u osób zdrowych.
- 2) Stężenie CRP i części badanych cytokin (IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 i IL-19) w surowicy było większe u pacjentów z aktywną ChLC niż nieaktywną postacią choroby oraz osób zdrowych.
- 3) Na podstawie stwierdzonej charakterystyki diagnostycznej jako markery-kandydatów w diagnostyce ChLC można wskazać IL-23 i IL-19, a w ocenie jej aktywności – CRP i IFN- γ .
- 4) W rozpoznawaniu / wykluczaniu aktywnej ChLC korzystną charakterystyką diagnostyczną cechowały się iloczyny stężeń (markery złożone): [CRP] \times [IL-10], [CRP] \times [IL-19], [CRP] \times [IFN- γ], [CRP] \times [IL-12] i [IFN- γ] \times [IL-19].
- 5) Potwierdzenie tych wyników w dalszych badaniach może stworzyć podstawę do rozszerzenia panelu markerów zapalnych stosowanych w rozpoznawaniu ChLC o IL-23 i IL-19, a w ocenie aktywności choroby – o CRP i IFN- γ . Niezbędna wtedy będzie standaryzacja i automatyzacja oznaczeń IL-19, IL-23 i IFN- γ .

7. Piśmiennictwo

1. Rydzewska G, Bartnik W[†]. Choroba Leśniowskiego i Crohna. w: Gajewski P. (red.) *Interna Szczeklika 2021. Medycyna Praktyczna Kraków 2021*, 1087-1092.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380: 1590-606.
3. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 1088-1103.
4. Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Przeegl Gastroenterol* 2007; 2 (5): 216-229.
5. Zhang Y, Li Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 91-9.
6. Bryniarski K. Odporność nabyta. w: Bryniarski K(red.) *Immunologia*. - Urban&Partner Wrocław 2020, 43-83.
7. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflam Bowel Dis* 2011; 17: 362-81.
8. Pituch-Noworolska A, Siedlar M. Endokrynopatie i problemy gastrologiczne o podłożu zapalnym. *Podstawy mechanizmów autoimmunizacji*. W: Bryniarski K(red.) *Immunologia*. Urban&Partner Wrocław 2020, 247-260.
9. Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, et al. Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 46-54.
10. Baumgart DC, Thomas S, Przesdzing I, et al. Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 423-36.
11. Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemonia H. Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. *Postepy Hig Med. Dosw* 2009; 63: 389-94.
12. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-8.
13. Chen ML, Sundrud MS. Cytokine networks and T cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 2: 1157-67.
14. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Immunity* 2019; 50: 992-1006.
15. Lee SH, Kwon J, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res* 2018; 16: 2642.
16. Gomollón F, Dignass A, Annese V, et al. on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohn's Colitis* 2017, 3-25.
17. Chen W, Fan JH, Luo W, et al. Effectiveness of interferon-gamma release assays for differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8133-40.
18. Singh UP, Singh NP, Murphy EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 2016; 77: 44-9.
19. Vasilyeva E, Abdulkhakov S, Cherepnev G, et al. Serum cytokine profiles in children with Crohn's disease. *Med Inflamm* 2016; 2016: 7420127.

20. Chen P, Zhou G, Lin J, et al. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. *Front Med* 2020; 7: 123.
21. Furfaro F, Gilardi D, Allocca M, et al. IL-23 blockade for Crohn's disease: next generation of anti-cytokine therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13: 457-67.
22. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-44.
23. Benitez JM, Meuwis MA, Reenaers C, Van Kemseke C, Meunier P, Louis E. Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* 2013; 62: 1806-16.
24. Peloquin JM, Pardi DS, Sandborn WJ, et al. Diagnostic ionizing radiation exposure in a population-based cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2015-22.

8. Streszczenie

Wstęp

Choroba Leśniowskiego i Crohna (ChLC), jedna z nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ), jest pełnościennym, zwykle ziarniniakowym, zapaleniem, które może objąć każdy odcinek przewodu pokarmowego. Głównym mechanizmem zapalenia jelit w ChLC jest brak równowagi pomiędzy limfocytami efektorowymi Th1 i Th17, działającymi poprzez wydzielanie IFN- γ , TNF- α i interleukin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-12, IL-17, IL-22 i innych mediatorów, a regulatorowymi komórkami T (Treg) wydzielającymi IL-10, IL-35 i TGF- β . Chociaż rola wielu cytokin w patogenezie i przebiegu klinicznym ChLC jest szeroko badana i dobrze wyjaśniona, nie są one wykorzystywane do celów diagnostycznych. Opublikowano wiele prac na temat sieci cytokin i profili ich stężeń w surowicy w NChZJ, jednak dane dotyczące ich charakterystyki diagnostycznej są skąpe.

Celem pracy było porównanie stężeń w surowicy markerów / mediatorów stanu zapalnego: CRP, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-19 i IL-23 oraz wyników ich mnożenia między pacjentami z ChLC, jej postacią aktywną i nieaktywną i grupą kontrolną oraz ocena ich charakterystyki diagnostycznej w rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC i jej aktywnej fazy.

Metodyka

Grupa badana składała się z 49 pacjentów z ChLC przypisanych do podgrup z chorobą aktywną (33 pacjentów) i nieaktywną (16 pacjentów) na podstawie CDAI oraz 31 zdrowych osób w grupie kontrolnej. Stężenie CRP w surowicy oznaczano metodą immunonefelometryczną, a cytokin – metodą ELISA. Poziomy markerów/ mediatorów i wyniki ich mnożenia: [IL-6]×[CRP], [IL-17A]×[CRP], [IL-23]×[CRP], [IL-6]×[IL-17A], [IL-6]×[IL-23], [IL-17A]×[IL-23], [IL-6]×[IL-10], [IL-6]×[IL-19], [IL-6]×[IFN- γ], [CRP]×[IL-10], [CRP]×[IL-19], [CRP]×[IFN- γ], [IL-10]×[IL-19], [IL-10]×[IFN- γ] i [IL-19]×[IFN- γ] porównano między badanymi grupami. Oceniono ich charakterystykę diagnostyczną w rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC i jej aktywnej postaci, w tym czułość, swoistość, wartości predycyjne wyników, ilorazy prawdopodobieństw i pole pod krzywą ROC (AUC).

Wyniki

Stężenia CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-19 i IL-23 w surowicy oraz ich iloczyny były znacząco większe u pacjentów z ChLC niż w grupie kontrolnej ($p < 0,0001-0,007$). Poziomy CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12 i IL-19 oraz wyniki ich mnożenia były znacząco większe u pacjentów z aktywną niż nieaktywną chorobą oraz w grupie kontrolnej ($p < 0,0001-0,026$). Stężenia IFN- γ i IL-12 w surowicy korelowały z wartościami CDAI.

W rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC najlepiej wypadła IL-23 z czułością diagnostyczną 0,96, swoistością 0,97, PPV 0,98, NPV 0,94, LR+ 29,9, LR- 0,004 i AUC 0,994. Podobne cechy diagnostyczne miały iloczyny stężeń IL-23 i CRP, IL-6 i IL-17A. Iloczyny [CRP]×[IL-19] i [IL-6]×[IFN- γ] miały swoistość 0,96, PPV 0,97 i LR+ odpowiednio 15,0 i 15,5. Stężenie IL-19 w surowicy i iloczyny [IL-6]×[IL-12] i IFN- γ ×[IL-12] miały w wykluczaniu ChLC czułość 0,9-0,96, NPV 0,75-0,86 i LR- 0,09-0,18. AUC dla tych markerów wynosiło 0,776-0,807.

W rozpoznawaniu aktywnej ChLC stężenie CRP w surowicy miało swoistość i PPV 1,0 oraz AUC 0,84, natomiast iloczyny [CRP]×[IL-10] i [CRP]×[IL-19] – swoistość 0,98, PPV 0,96,

LR+ odpowiednio 33,4 i 30,5 oraz AUC odpowiednio 0,896 i 0,895. Stężenie IFN- γ w surowicy i iloczynny [CRP] \times [IFN- γ], [CRP] \times [IL-12] i [IFN- γ] \times [IL-19] miały w wykluczaniu aktywnej ChLC czułość 0,77-0,94, NPV 0,86-0,93, LR- 0,11-0,24 i AUC 0,781–0,904.

IL-6, IL-10, IL-12 i IL-17A, jako pojedyncze markery, okazały się nieprzydatne w rozpoznawaniu / wykluczaniu ChLC lub jej aktywnej postaci, chociaż wymienione zawierające je markery złożone (iloczynny) miały obiecującą charakterystykę diagnostyczną.

Wnioski

Stężenia CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-19 i IL-23 w surowicy były znamienne większe u pacjentów z ChLC niż w grupie kontrolnej, a stężenia CRP, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 i IL-19 – znamienne większe u pacjentów z aktywną niż nieaktywną postacią choroby oraz w grupie kontrolnej.

Stężenia IL-23, CRP, IFN- γ i IL-19 w surowicy oraz niektóre iloczynny stężeń wykazały obiecującą charakterystykę diagnostyczną w rozpoznawaniu /wykluczaniu ChLC i jej aktywnej postaci, co wymaga dalszych badań. W przypadku potwierdzenia ich korzystnych cech diagnostycznych konieczna będzie standaryzacja i automatyzacja oznaczeń IFN- γ , IL-19 i IL-23 przed ich wdrożeniem do praktyki klinicznej.

9. Summary

Introduction

Crohn's disease (CD), one of the inflammatory bowel diseases (IBD), is a transmural, usually granulomatous inflammation that can affect any part of the gastrointestinal tract. The main mechanism of intestinal inflammation in CD is the imbalance between Th1 and Th17 effector lymphocytes acting through the secretion of IFN- γ , TNF- α , pro-inflammatory interleukins such as IL-6, IL-12, IL-17, IL-22 and other mediators, and regulatory T cells (Treg) secreting IL-10, IL-35 and TGF- β . Although the role of many cytokines in the pathogenesis and clinical course of CD is widely researched and well explained, they are not used for diagnostic purposes. Many articles have been published on the cytokine networks and serum level profiles in IBD, but data on their diagnostic characteristics are scarce.

The aim of the study was to compare the serum concentrations of inflammatory markers / mediators, including CRP, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-19 and IL-23, and the results of their multiplication between patients with CD, its active and inactive form and a control group and the assessment of their diagnostic characteristics in the diagnosis / exclusion of CD and its active phase.

Methods

The study group consisted of 49 patients with CD assigned to the active (33 patients) and inactive (16 patients) disease subgroups based on CDAI, and 31 healthy controls. Serum CRP was measured using immunonephelometry and cytokines – using ELISA. Serum mediator / marker levels and their multiplication results, including [IL-6]×[CRP], [IL-17A]×[CRP], [IL-23]×[CRP], [IL-6]×[IL-17A], [IL-6]×[IL-23], [IL-17A]×[IL-23], [IL-6]×[IL-10], [IL-6]×[IL-19], [IL-6]×[IFN- γ], [CRP]×[IL-10], [CRP]×[IL-19], [CRP]×[IFN- γ], [IL-10]×[IL-19], [IL-10]×[IFN- γ] and [IL-19]×[IFN- γ] were compared between the study groups. Their diagnostic characteristics for the diagnosis / exclusion of CD and its active form were assessed, including sensitivity, specificity, predictive values of the result; likelihood ratios and area under the ROC curve (AUC).

Results

Serum levels of CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-19 and IL-23, and their multiplication results were significantly higher in CD patients than in controls ($p < 0.0001-0.007$). The levels of CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12 and IL-19, and their multiplication results were significantly higher in patients with active than inactive disease and controls ($p < 0.0001-0.026$). Serum IFN- γ and IL-12 levels correlated with CDAI values.

In the diagnosis / exclusion of CD, IL-23 performed best with diagnostic sensitivity 0.96, specificity 0.97, PPV 0.98, NPV 0.94, LR+ 29.9, LR- 0.004 and AUC 0.994. Similarly performed multiplications of serum IL-23 and CRP, IL-6 and IL-17A. The [CRP]×[IL-19] and [IL-6]×[IFN- γ] results had a specificity 0.96, PPV 0.97 and LR+ 15.0 and 15.5, respectively. Serum IL-19 and the [IL-6]×[IL-12] and IFN- γ ×[IL-12] results had a sensitivity 0.9-0.96, NPV

0.75-0.86 and LR- 0.09-0.18 in the exclusion of CD. The AUC for these markers was 0.776-0.807.

In the diagnosis of active CD, serum CRP had a specificity and PPV 1.0 and AUC 0.84, while the [CRP]×[IL-10] and [CRP]×[IL-19] results – a specificity 0.98, PPV 0.96, LR+ 33.4 and 30.5, and AUC 0.896 and 0.895, respectively. Serum IFN- γ and the [CRP]×[IFN- γ], [CRP]×[IL-12] and [IFN- γ]×[IL-19] results had a sensitivity 0.77-0.94, NPV 0.86-0.93, LR- 0.11-0.24 and AUC 0.781–0.904 in excluding active CD.

IL-6, IL-10, IL-12 and IL-17A, as single markers, turned out not to be useful in the diagnosis / exclusion of CD or its active form, although the listed combined markers (multiplication results) containing them had promising diagnostic characteristics.

Conclusions

Serum CRP, IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17A, IL-19 and IL-23 levels were significantly higher in patients with CD than in the control group, and the concentrations of CRP, IFN- γ , 6, IL-10, IL-12 and IL-19 - significantly higher in patients with active than inactive form of the disease and in the control group.

Serum IL-23, CRP, IFN- γ and IL-19 levels and some of the results of their multiplication showed promising diagnostic characteristics in the diagnosis / exclusion of CD and its active form, which requires further studies. If their favorable diagnostic features are confirmed, it will be necessary to standardize and automate the IFN- γ , IL-19 and IL-23 assays before their implementation in clinical practice.

10. Oświadczenia współautorów publikacji

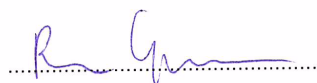
Kraków, dnia 03.11.2022

Dr n.med. Dorota Pawlica-
Gosiewska
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 20% i polegał na udziale w przygotowaniu planu badań, analizie statystycznej wyników oraz wykonywaniu badań laboratoryjnych .

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/


Kraków, dnia 03.11.2022

Dr n.med. Katarzyna Gawlik
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 7 % i polegał na udziale w wykonywaniu badań laboratoryjnych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....

/podpis współautora/

Katedra Biochemii Klinicznej UJ CM

dr n. med. Katarzyna Gawlik
Adiunkt

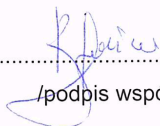
Kraków, dnia 03.11.2022

Prof. dr hab. Bogdan Solnica
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 10% i polegał na udziale w opracowywaniu wyników badań oraz redagowaniu manuskryptu tej pracy.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


.....
/podpis współautora/

Kraków, dnia 20.10. 2022

Prof. dr hab. Danuta Owczarek
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 6% i polegał na rekrutacji i ocenie klinicznej pacjentów do badań.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/

Prof. dr hab. med. Danuta Owczarek
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista gastroenterologii
2366639

Kraków, dnia 20.10.2022

Lek. med. Halina Pocztar
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 5% i polegał na rekrutacji pacjentów do badań.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....
Pocztar
/podpis współautora/

Lek. med. Halina Pocztar
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista gastroenterologii
2039107


Kraków, dnia 20.10.2022

Prof. dr hab. Tomasz Mach
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 6% i polegał na rekrutacji i ocenie klinicznej pacjentów do badań.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....
/podpis współautora/

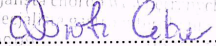
Kraków, dnia 20.10.2022

Dr hab. n. med. Dorota Cibor
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Serum inflammatory markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity , Czasopismo: Archives of Medical Science, 2021 : Vol. 17, nr 1, s. 252-257, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 6% i polegał na rekrutacji i ocenie klinicznej pacjentów do badań.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Dr med. Dorota Cibor
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista gastroenterologii i hepatologii


/podpis współautora/

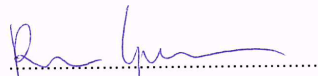
Kraków, dnia 07.11.2022

Dr n.med. Dorota Pawlica-
Gosiewska
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Archives of Medical Science
DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>
Copyright © 2022 Termedia & Banach
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 20% i polegał na udziale w przygotowaniu planu badań, analizie statystycznej wyników oraz wykonywaniu badań laboratoryjnych .

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/

Kraków, dnia 20.10.2022

Prof. dr hab. Bogdan Solnica
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

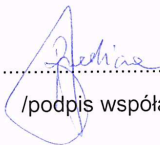
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Arch Med Sci

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645> Copyright © 2022 Termedia & Banach

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 10 % i polegał na udziale w opracowywaniu wyników badań oraz redagowaniu manuskryptu tej pracy.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


.....
/podpis współautora/

Kraków, dnia 20.10.2022

Prof. dr hab. Danuta Owczarek
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Arch Med Sci

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>

Copyright © 2022 Termedia & Banach

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 6% i polegał na rekrutacji pacjentów do badań i ocenie klinicznej.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/

Prof. dr hab. med. Danuta Owczarek
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista gastroenterologii
2360839

Kraków, dnia 20.10.2022

Dr n.med. Katarzyna Gawlik
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Archives of Medical Science
DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>
Copyright © 2022 Termedia & Banach
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 8 % i polegał na udziale w wykonywaniu badań laboratoryjnych.
Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....
/podpis współautora/

Katedra Biochemii Klinicznej UJ CM

dr n. med. Katarzyna Gawlik
Adiunkt

Kraków, dnia 20.10.2022

Dr hab. Małgorzata Malczewska-
Malec Prof. UJ
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. : „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Archives of Medical Science
DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>

Copyright © 2022 Termedia & Banach

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 10 % i polegał na udziale w przygotowaniu planu badań oraz redagowaniu manuskryptu pracy.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



Podpis współautora/
Katedra Biochemii Klinicznej,
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM

Dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ
p.o. kierownik

Kraków, dnia 20.10.2022

Dr hab. n. med. Dorota Cibor
Klinika Gastroenterologii i
Hepatologii
Szpital Uniwersytecki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as candidate markers in the diagnosis and assessment of Crohn's disease activity”, Czasopismo: Arch Med Sci

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms/152645>

Copyright © 2022 Termedia & Banach Archives of Medical Science oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: 6% i polegał na rekrutacji pacjentów do badań i ocenie klinicznej.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Krystyny Słowińskiej-Solnicy przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Dorota Cibor
specjalista chorób wewnętrznych
szpital Uniwersytecki
980033976

/podpis współautora/