



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
Факултет по медицина

Катедра “Обща медицина и клинична лаборатория”

Д-р Марияна Георгиева Йорданова

**СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОХИМИЧНИ МАРКЕРИ
В РАЗЛИЧНИ БИОЛОГИЧНИ МАТРИЦИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С
ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ГАСТРО-ИНТЕСТИНАЛНИЯ
ТРАКТ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „ДОКТОР“

**Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, Професионално
направление: 7.1. Медицина, Научна специалност: Клинична лаборатория**

Научен ръководител: доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.

Научен консултант : проф. Маргаритка Бончева, д.м.

Варна, 2021

Дисертационният труд съдържа 216 страници и е онагледен с 52 таблици и 53 фигури. Библиографията включва 414 литературни източника, от които 3 на кирилица и 411 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден от Катедрен съвет на Катедра „Обща медицина и клинична лаборатория” към Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов” - Варна на 6.01.2021год. и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф. д-р Красимира Икономова, дм

Проф. д-р Ивайло Въжаров, дм

Доц. д-р Милена Велизарова, дм

Доц. д-р Яна Бочева, дм

Доц. д-р Даниела Герова, дм

Публичната защитата на дисертационния труд ще се състои на..... 2021 г. от часа в аудитория „Проф. Владимир Иванов“ на МУ-Варна на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в отдел „Научна дейност и кариерно развитие“ и на сайта на Медицински Университет Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪДЪРЖАНИЕ

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
1. Изследвани лица:	11
2. Биологични материали.....	12
3. Методи на изследване	12
3.1 Кръвни изследвания.....	12
3.2 Изследване на лабораторни показатели в слюнка	14
3.3 Изследване на лабораторни показатели във фецес.....	16
4. Статистически методи	16
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	17
1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на избрани биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка:	17
1.1. Разработване правила за събиране, обработка и съхранение на орална течност, съобразени с преданалитичните изисквания.....	17
1.2. Оптимизиране и валидиране на методи за изследване на някои от биохимичните показатели в слюнка.....	18
1.2.1. Валидиране на dROMs тест – метод за определяне ROS	18
1.2.2. Валидиране на SAT тест – метод за определяне на антиоксидантния капацитет на слюнката	19
1.2.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин IgA	21
1.2.4. Валидиране на метод за изследване на нитрити в слюнка.....	22
2. Проучване на биологичните вариации на избрани биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтния им интервал	25
2.1. Влияние на пол и възраст.....	25
2.2. Влияние на тютюнопушенето	26
2.3. Референтни граници	30
3. Проучване на биологичната вариация и определяне на референтния интервал на маркери, оценяващи оксидативния стрес в слюнка и серум от здрави лица.	33
3.1 Влияние на пол и възраст върху показателите за ОС в слюнка	33
3.2 Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в слюнка.....	34
3.3 Влияние на пол и възраст върху показателите на ОС в серум	34

3.4	Определяне на референтни граници на показателите на ОС в слюнка и серум.....	37
4.	Проучване на корелативни връзки между изследваните слюнчени и серумни показатели.....	38
5.	Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични заболявания на горния ГИТ	40
5.1.	Характеристика на пациентите с хронични гастрити	40
5.2.	Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при хронични гастрити и установяване на корелационни зависимости между тях.....	42
5.3.	Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с хронични гастрити	52
5.4.	Резултати и обсъждане от изследването на серумни показатели за оксидативен стрес при пациенти с хронични гастрити	54
5.5.	Корелационни зависимости между изследваните параметри в слюнка и серум с рутинни лабораторни изследвания и ендоскопските промени в стомаха.....	56
5.6.	Диагностичен потенциал на изследваните слюнчени и серумни параметри при хроничните гастрити.....	62
6.	Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания	65
6.1.	Характеристика на пациентите с ХВЧЗ.....	65
6.2.	Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при ХВЧЗ и оценка на диагностичния им потенциал	67
6.3.	Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с ХВЧЗ	76
6.4.	Резултати и обсъждане от изследването на слюнчени и серумни нива на ROS и антиоксидантен капацитет при пациенти с ХВЧЗ, корелационни взаимовръзки с активността на заболяването и оценка на диагностичния им потенциал	78
7.	Значение, корелационни взаимовръзки с активността на заболяването и диагностичен потенциал на нови биомаркери: фекален калпротектин и серумна аденозиндезаминаза за диагностиката и мониториране на пациенти с ХВЧЗ и сравнение с утвърдените маркери на възпаление.....	86
V.	ИЗВОДИ	96
VI.	ПРИНОСИ	98
VII.	ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	99
БЛАГОДАРНОСТИ	100

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

ГИТ	–	гастроинтестинален тракт
ОС	–	оксидативен стрес
ХСЧЗ	–	хронични стомашно-чревни заболявания
БК	–	болест на Крон
УК	–	улцерозен колит
СУЕ	–	скорост на утаяване на еритроцитите
ПКК	–	периферна кръвна картина
ОМИ	–	остър миокарден инфаркт
ЦНС	–	централна нервна система
КС	–	кортикостероиди
НСПВС	–	нестероидни противовъзпалителни средства
ХГ	–	хроничен гастрит
ЯБ	–	язвена болест

На латиница

ADA	–	adenosine deaminase
ALB	–	albumin
AOC	–	antioxidant capacity
ASAT	–	aspartate transaminase
BAР	–	biological antioxidant potential
C3	–	C3 complement
DNA	–	deoxyribonucleic acid
dROMs	–	reactive oxygen metabolites
EC	–	epithelial cells
FC	–	fecal calprotectin
GSHP	–	glutathione peroxidase
IBS	–	irritable bowel syndrome
IFCC	–	International Federation of Clinical Chemistry
IgG	–	immunoglobulin G
IBD	–	inflammatory Bowel Disease
HP	–	Helicobacter pylori
LDH	–	lactate dehydrogenase

Lfer	–	lactoferrin
NO	–	nitrogen oxide
NOS	–	nitric oxide synthase
RBC	–	red blood cells
RNS	–	reactive nitrogen species
ROS	–	reactive oxygen species
RNA	–	Ribonucleic acid
sAA	–	salivary alpha-amylase
SAT	–	salivary antioxidant test
sIgA	–	secretory immunoglobulin A
SOD	–	superoxide dismutase
TAC	–	total antioxidant capacity
TP	–	total protein
UA	–	uric acid
WBC	–	white blood cells
FRAP	–	ferric reducing antioxidant power
TBARS	–	thiobarbituric acid reactive substances

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничните стомашно-чревни заболявания са сериозен социален и медицински проблем за съвременния човек с увеличаваща се заболяемост в световен мащаб, поради нарушени хранителни навици, стрес, употреба на множество медикаменти, лоша устна хигиена и контаминация с *Helicobacter pylori* (HP), тютюнопушене и злоупотреба с алкохол. Хроничните стомашно-чревни заболявания се срещат при млади хора в активна възраст, имат хроничен персистиращ ход с разнообразно и непредсказуемо протичане с редуване на периоди на клинично обостряне и на ремисия. При тях често настъпват редица сериозни усложнения, водещи до инвалидизация. Тези особености в клиничното протичането на заболяванията води до нарушено качество на живот и увеличава здравните разходи. Ендоскопската и хистологичната оценки се считат за незаменими или „златен“ стандарт в диагностицирането на хроничните заболявания на гастро-интестиналната система (ГИТ), но пациентите изпитват страх от инвазивните манипулации, поради което често игнорират симптомите, прилагат самолечение и търсят късно лекарска помощ.

Цел на съвременната гастроентерологична диагностика е откриване и въвеждане на специфични маркери, които да отразяват локалните процеси на възпаление и да корелират добре с ендоскопската и хистологична находка, с което да се спомогне на диагностиката, мониторирането и терапевтичното управление на заболяванията на ГИТ, както и да се намали процента на инвазивните ендоскопски изследвания. Желателно е тези биомаркери да могат да се изследват в неинвазивно добит биологичен материал, да са лесно изпълними, евтини и необременяващи за пациента.

Устната кухина е тясно свързана морфо-функционално и филогенетично с гастро-интестиналния тракт. При редица заболявания, засягащи ГИТ, се наблюдават съответни промени в устната кухина. От друга страна тя се явява входна врата за проникване на различни инфекции, повлияващи общото здраве на индивида.

Слюнката и фецесът са естествено свързани с ГИТ и представляват сложни и динамични системи, съдържащи разнообразни органични и неорганични съединения с различен произход. Съставът им се променя както при локални, така и при системни заболявания, което ги превръща в удачен и перспективен биологичен материал за откриване и изследване на нови биомаркери, спомагащи диагностиката, мониторирането на хода и терапията на гастро-интестиналните заболявания. Неинвазивното и лесно добиване на тези биологични материали е щадящо и приемливо за пациентите като алтернатива за избягване на честите,

неприятни и рискови манипулации като гастро-колоноскопии и биопсии при проследяване хода на хроничните заболявания на ГИТ.

Въпреки предимствата, които предоставят, слюнката и фецесът са все още ненапълно изучени и недостатъчно използвани в рутинната лабораторна практика.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се проучат, валидират и сравнят подобрани биохимични маркери и клетъчни елементи в различни биологични матрици (слюнка, серум и фецес) и да се изясни ролята им за диагностиката и мониторирането на пациенти с хронични заболявания на горния и долен отдел на гастроинтестиналния тракт.

От така формулираната цел произтичат следните задачи:

- 1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрани биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка:**
 - 1.1. Разработване правила за събиране, обработка и съхранение на орална течност, съобразени с преданалитичните изисквания.
 - 1.2. Оптимизиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрани биохимични показатели в слюнка:
 - 1.2.1. Валидиране на dROMs тест – метод за определяне на ROS
 - 1.2.2. Валидиране на SAT тест – метод за определяне на антиоксидантния капацитет на слюнката
 - 1.2.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин А (sIgA)
 - 1.2.4. Валидиране на метод за изследване на нитрити в слюнка
- 2. Проучване на биологичните вариации на подобрани биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтния им интервал:**
 - 2.1. Биохимични показатели – пикочна киселина (UA), общ белтък (TP), албумин (ALB), алфа-амилаза (sAA), лактат дехидрогеназа (LDH), нитрити и секреторен IgA (sIgA).
 - 2.2. Клетъчни елементи – еритроцити (RBC), левкоцити (WBC), епителни клетки (EC) и бактерии.
- 3. Проучване на биологичната вариация и определяне на референтния интервал на маркери, оценяващи оксидативния стрес в слюнка и серум от здрави лица**
- 4. Проучване на корелативни връзки между изследваните слюнчени и серумни показатели**
- 5. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични заболявания на горния ГИТ:**
 - 5.1. Изследване на подобраните слюнчени и серумни параметри при хронични гастрити и установяване на корелационни зависимости между тях

- 5.2. Изследване клетъчния състав на слюнката при пациенти с хронични гастрити
- 5.3. Изследване на серумни нива на реактивни кислородни форми (dROMs тест) и антиоксидантен капацитет (ВАР тест) при пациенти с хронични гастрити
- 5.4. Корелационни зависимости между изследваните параметри в слюнка и серум с рутинни лабораторни показатели и ендоскопските промени в стомаха
- 5.5. Диагностичен потенциал на изследваните слюнчени и серумни параметри при хроничните гастрити
- 6. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум и фецес от пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ):**
 - 6.1. Изследване на подбраните слюнчени и серумните параметри при хронични възпалителни чревни заболявания и оценка на диагностичния им потенциал
 - 6.2. Изследване на клетъчния състав на слюнката при пациенти с ХВЧЗ
 - 6.3. Изследване на слюнчени и серумни нива на ROS и AOC (dROMs, SAT и ВАР тестове) при пациенти с ХВЧЗ, корелационни взаимовръзки с активността на заболяването и оценка на диагностичния им потенциал
- 7. Да се оцени значението, корелационните взаимовръзки с активността на заболяването и диагностичния потенциал на новите биомаркери: фекален калпротектин и серумна аденозиндезаминаза за диагностиката и мониториране на пациенти с ХВЧЗ и сравнение с утвърдените маркери на възпаление.**

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица:

В дисертационния труд са включени общо 300 индивида, подбрани през периода септември 2017 – юни 2019 година. От тях 114 са със заболявания на гастро-интестиналния тракт (ГИТ), а 186 са здрави доброволци.

Научното проучване е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – Варна с протокол № 64/13.07.2017 г. На всички участници е предоставено „Информирано съгласие за участие в проучването“, което е подписано собственоръчно от тях, съгласно изискванията на комисията. Личните данни на болните и резултатите от изследванията са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни и с Кодекса по професионална етика.

Групата на болните лица (114 пациента – 54 с хронични възпалителни чревни заболявания и 60 с хроничен гастрит) е формирана от пациенти, хоспитализирани в гастроентерологичните отделения на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и ВМА – МБАЛ – Варна по повод обостряне на заболяването или за рутинно мониториране хода на заболяването. Диагностицирането е извършено по стандартните клинични критерии и данните от клиницистите от съответните клинични звена на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и ВМА – МБАЛ – Варна.

Използвани са следните критерии за включване на болните лица в изследването:

- Пациенти над 18 годишна възраст с активиране на заболяването и пациенти в ремисия или с лека форма на заболяването (за ХВЧЗ) с клинична, хистологична и ендоскопски потвърдена диагноза за следните заболявания: болест на Крон (БК), улцерозен колит (УК), хроничен гастрит (доказано и антитела за НР и антигенно присъствие във фекална маса).
- Подписали информирано съгласие за извършване на ендоскопско изследване с взимане на биопсични проби, както и съгласие за взимане на биологичен материал – кръв, фекални проби и слюнка

Критерии за изключване на болни лица от участие в научното проучване:

- Пациентите не са подлежали на стоматологични манипулации в рамките на 48-72 часа и без наличие на локално възпаление в устната наличие на
- Наличие на тежки съпътстващи хронични физически и психични заболявания или злокачествено усложнение и/или скорошна хирургическа интервенция
- Не са употребявали алкохол и цигари два часа преди изследването

Групата на здравите доброволци (186 индивида на средна възраст 41.6 ± 8.91 год.) е формирана от преминаващи годишни профилактични прегледи лица към ВМА – МБАЛ – Варна, дали съгласие за участие в проучването, без отклонение в скрининговите лабораторни изследвания (ПКК, биохимични показатели и урина), без данни за стомашно-чревни или извънчревни тежки придружаващи заболявания и нормален стоматологичен статус.

2. Биологични материали

От всяко лице са взети следните биологични материали: кръв и нестимулирана слюнка, при строго спазване на преданалитичните изисквания. Фекални проби са събрани от цялата пациентска група, както и от двадесет и пет лица от контролната група. Всички биологични проби – етикетирани, кодирани и картотекирани, са съхранявани според указанията на производителите на лабораторни китове, изискванията за конфиденциалност и етика на научните проучвания.

Кръвните проби са взети в подходящите за целта сертифицирани вакутейнери, съответно за определяне на хематологични показатели, скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) и за отделяне на серум (изследване на биохимичните показатели). Серумният вакутейнер (с адитив активатор на съсирването) се центрофугира за 10 минути при 3500 грт и отделеният кръвен серум, разпределен в няколко аликвоти, се изработва веднага или съхранява при -20°C до момента на изследването.

Процедурата по събиране на нестимулирана слюнка е съобразена с преданалитичните изисквания и циркадни вариации. Събраната слюнка (2-3 мл) се центрофугира при 2500 грт, на стайна температура, за 5 мин. и надутаечната течност се използва за определяне на биохимичните показатели, а седиментът – за определяне на клетъчните елементи.

Фекалната проба се предоставя в специални за целта контейнери, обработва се според инструкциите на търговските китове, използвайки специални приспособления и буферни разтвори, осигуряващи стандартизирано екстрахиране на търсените анализи в биологичния материал и се изследват в рамките на деня.

3. Методи на изследване

3.1 Кръвни изследвания

- *Хематологични показатели:* Кръвната картина и скоростта на утаяване на еритроцитите (СУЕ) се определят с рутинни лабораторни методи съответно с помощта на проточно флоуцитометрично изследване на хематологичен

анализатор Sysmex XN1000 (Japan) и автоматично на апарат Sedi 15 (Becton Dickinson, USA).

- *Биохимични показатели*

Рутинните биохимични показатели, влизащи в диагностичния пакет за съответните заболявания, са изработени в Клинична лаборатория на ВМА-МБАЛ-Варна. Използвани са стандартизирани методи, препоръчвани от Международната федерация по клинична химия и лабораторна медицина (IFCC). Изследванията са осъществени с оригинални китове на производителите Beckman Coulter (USA), BioSystems S. A. (Spain) и Thermo Scientific на биохимични анализатори Olympus AU 640 и Indiko Plus USA. Изследвани са следните лабораторни параметри: общ белтък, албумин, пикочна киселина, алфа-амилаза, имуноглобулин А, серумно желязо, С-реактивен протеин, лактат дехидрогеназа, аденозиндезаминаза.

- *Определяне на показатели на оксидативен стрес:*

dROMs (*Reactive oxygen metabolites*) е кинетичен колориметричен тест, който служи за оценка на оксидативния стрес чрез определяне концентрацията на реактивни кислородни форми (ROS). Под действие на киселото рН от плазмените протеини се освобождава желязо, което по реакцията на Fenton катализира разпадането на хидропероксидите, генерирайки нови радикални видове. Те окисляват хромоген от реактива (ароматен амин – N, N-диетилпарафенилендиамин) като се получава продукт с розов цвят и абсорбционен максимум при $\lambda=505\text{nm}$. Стойността на отчетената абсорбция е пропорционална на концентрацията на реактивните кислородни форми от пробата. Резултатът се изразява като Carratelli Units (1 UCarr=0.08 mg% разтвор на водороден пероксид). Определянето на dROMs е извършено на полуавтоматичен спектрофотометър Free Carpe diem по оригинална програма на фирмата-производител на кита (Diacron International, Italy).

ВАР тестът (*Biological antioxidant potential*) е предназначен за определяне на общия антиоксидантен потенциал на плазма/серум, измерващ общата концентрация на антиоксиданти в кръвта като билирубин, пикочна киселина, витамин С, протеини и др., способни да редуцират желязото от фери йони (Fe^{3+}) до феро йони (Fe^{2+}). Антиоксидантите, съдържащи се в кръвната плазма обезцветяват хромогена, съдържащ железен хлорид и тиоцианат при $\lambda=505\text{nm}$. Степента на обезцветяването е пропорционална на редуциращата способност на антиоксидантите, съдържащи се в плазмата. Определянето на антиоксидантния капацитет (АОС) е извършено на полуавтоматичен спектрофотометър Free Carpe diem по оригинална програма на фирмата-производител на кита (Diacron International, Italy).

- *Определяне на антитела срещу НР в серум*

Количественото определянето на IgG антитела спрямо НР в серум е извършено на имунохимичен анализатор LIAISON® (DiaSorin, Italy) с помощта на хемилуминесцентен имуноанализ (CLIA) с реактиви на същия производител (затворена система).

3.2 Изследване на лабораторни показатели в слюнка

- *pH и относително тегло (SG)* Измерването се осъществява посредством тест лента за урина на уринен анализатор Dirui H-500, China.

- *sIgA*

Концентрацията на общия sIgA е определена с готов търговски кит на DiaMetra, Italy, чрез ензимен имуносорбентен анализ (ELISA). Отчитането е извършено на ELISA Strip Reader (Italy). Като нерутинно използван метод в клиничната лаборатория, се наложи валидирането му.

- *Общ белтък и албумин (TP и ALB)*

Анализът на TP и ALB е извършен на биохимичен анализатор Olympus AU 640 с реактиви на Beckman Coulter (Urinary/CSF Protein и Urine CSF albumin) и програми за уринен анализ, гарантиращи надеждното им количествено определяне, когато са в ниски концентрации.

- *Пикочна киселина (UA)*

Пикочната киселина е определена с ензимен колориметричен метод спектрофотометрично на биохимичен анализатор Olympus AU 640 с реактив на Beckman Coulter. Използвана е серумната програма, тъй като по литературни данни нивата на UA в слюнка и серум не се различават значимо (Riis et al., 2018).

- *Слюнчена алфа-амилаза (sAA)*

Активността на sAA е определена на биохимичен анализатор Indiko Plus (USA) с реактив на Thermo Scientific. Избра се този кинетичен-колориметричен метод, тъй като има широк линеен диапазон и възможност за автоматично разреждане (10-24000 U/L).

- *LDH*

Активността на ензима LDH е определена на биохимичен анализатор Indiko Plus (USA) с реактив на Thermo Scientific, оптимизиран по IFCC. Избран е този кинетичен UV метод, тъй като субстратът и кофакторът са в по-оптимални концентрации спрямо нормално откриващите се по-високи стойности на LDH в слюнката.

- *Определяне на показатели на оксидативен стрес и антиоксидантна защита:*

Нитрити

Изследването на нитритите в слюнка е осъществено с реактив Nanocolor Nitrite (Macherey-Nagel, GmbH&Co.KG, Germany) на полуавтоматичен спектрофотометър Free Care diem. Анализът се основава на принципа на способността на нитритите да взаимодействат с първични ароматни амини, образувайки оцветени диазосъединения (метод на Griesse), които имат абсорбционен максимум при $\lambda=520\text{nm}$. Методът е разработен от производителя за определяне на нитрити в питейни води. Това налага валидирането му, когато се използва за определяне на нитрити в слюнка.

d-ROMs тест (Diacron International, Italy)

Тестът е разработен и валидиран от производителя единствено за серум (виж стр. 13). Това налага валидирането му, когато се използва за определяне на реактивни кислородни форми в слюнка.

Антиоксидантен капацитет на слюнка (Saliva Antioxidant capacity Test – SAT)

Определянето на АОС на слюнка е осъществено с кит SAT (H&D srl Parma, Italy) на полуавтоматичен спектрофотометър Free Care diem. SAT тестът се основава на същия принцип като този на ВАР теста за серум (стр. 13), но в състава на реагентите е добавена циркониева сол, свързваща фосфатите в слюнката. Това предотвратява значимата им интерференция в окислително-редукционните реакции. Тъй като не е рутинно използван метод, се наложи валидирането му.

- *Броене и диференциране на клетъчни елементи в слюнка*

Броенето на клетки е осъществено с помощта на автоматичен уринен анализатор за седимент FUS-100 (Changchun DIRUI Industrial Co.,Ltd). Методът се основава на флоуцитометрично микроскопско високоскоростно заснемане на изображения за изброяване и идентификация на формените елементи в пробата. Образите на клетките от пробата се сравняват със заложената в софтуера на апарата база данни от образи на разнообразие от формени елементи и кристали и се класифицират според формата, строежа и размера, а според броя на изображенията се изчислява техния брой, изразен като брой/ μL . Морфологичните характеристики на различните клетъчни елементи, получени от автоматичния анализ, се верифицират и визуално. Особеността на слюнката като биологична проба, отличаваща я значимо от уринната проба е, че тя е с голям вискозитет, от съдържащите с муцинозни протеини. Това затруднява анализа и води до значими вариации в обема на аспирираната проба. За да бъдат апаратно определени и диференцирани клетъчните елементи в слюнка е необходимо, пробата първо да се центрофугира, а утаеният седимент в последствие да се ресуспендира със съответен изотоничен буфер до първоначалното количество слюнка.

3.3 Изследване на лабораторни показатели във фецес

- *Фекален калпротектин (FC)*

Количественото определяне на FC е осъществено с помощта на РОСТ системата, разработена от BÜHLMANN Laboratories AG, Switzerland, базирана на имунохроматографски принцип. Цялата процедура по екстракцията е изпълнена стриктно според инструкциите на производителя. Отчитането на резултатите е извършено на Quantum Blue®Reader, BÜHLMANN. Използвани са двата продукта, с два различни концентрационни диапазона на детекция 30÷300 µg/g (Quantum Blue®fCAL) и 100÷1800 µg/g (Quantum Blue®fCAL High Range). Крайният резултат се представя в микрограм на грам фецес (µg/g).

- *Доказване на Helicobacter pylori (HP) антиген*

Доказването на наличен HP-антиген във фекална маса е осъществено посредством качествения имунохимичен РОСТ тест Nadal®H.pylori Ag Test (nal von minden GmbH, Germany) с аналитична чувствителност ≥ 50 ng/mL.

4. Статистически методи

Статистическият анализ на суровите данни бе извършен чрез дескриптивна статистика за таблично и графично представяне на получените резултати; тест на Kolmogorov-Smirnov; вариационен анализ, корелационен коефициент на Spearman; корелационен коефициент на Pearson, тест на Mann-Whitney; t-тест; ANOVA с корекция по Bonferroni; ROC анализ.

Статистическият анализ на получените резултати е направен с помощта на софтуер GraphPad Prism v.6.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA чрез стандартни статистически методи:

При всички проведени статистически анализи е прието допустимо ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза $p < 0.05$.

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрани биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка:

1.1. Разработване правила за събиране, обработка и съхранение на орална течност, съобразени с преданалитичните изисквания

Пробонабирането и техниката на вземане на проби от слюнка е първият и особено важен етап от аналитичния процес, от който зависи надеждността на резултатите. След задълбочено проучване на литературните данни за целите на научното проучване се реши да се използва цяла нестимулирана слюнка.

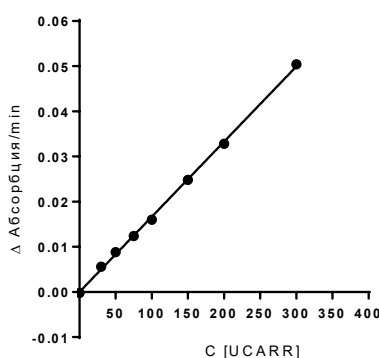
Пробонабирането е съобразено с циркадните ритми на секреция и влиянието на оралните стимуланти (хранене, пиене и хигиена на устната кухина) и е спазено условието да са минали повече 30 минути от последното хранене, пиене (кафе и други тонизиращи напитки), дъвчене на дъвка или от последното измиване на зъбите и употреба на продукти за устна хигиена. Информацията относно тютюнопушене е осигурена чрез попълване на разработен за целта кратък въпросник.

Оралната течност се събира сутрин от 8 до 10 часа в специални стерилни полистиренови контейнери, градуирани и с конично дъно. Пет минути преди самото изследване устата се изплаква двукратно с физиологичен разтвор или трапезна/минерална вода посредством жабурене за 10 секунди. Спонтанно събраната в долната част на устната кухина слюнка (без изсмукване), чрез пасивно неколнократно отделяне се събира в контейнера до количество (2÷3 ml) в рамките на 5-6 минути. Биологичните проби се центрофугират при стайна температура, 2500 rpm в продължение на 5 минути. Надстоящата течност, предназначена за определяне на биохимичните параметри, внимателно се отпипетира и аликвотни количества от нея са поставени в микротейнери тип Елендорф и се съхраняват при температура -20°C. Поради хипотоничния характер и изобилието на бактерии, броенето на клетките се осъществява веднага на автоматичен уринен анализатор за седимент FUS-100 (Changchun DIRUI Industrial Co., Ltd) след ресуспендиране на отделения седиментът с дилуент на производителя до първоначалния обем.

1.2. Оптимизиране и валидиране на методи за изследване на някои от биохимичните показатели в слюнка

1.2.1. Валидиране на dROMs тест – метод за определяне ROS

За определяне на реактивните кислородни форми (ROS) в слюнка е използван dROMs тест (Diacron International, Italy), предназначен за определяне на ROS в серум. Основание да се използва този тест като удачен за друг вид биологичен материал са редица научни изследвания, в които той успешно е прилаган за определяне на ROS в семенна течност от животински модели, урина, мононуклеарни клетки от периферна кръв др. За определяне линейността на метода са използвани серия от специфични калибратори, изготвени с помощта на артифициална слюнка (Artificial saliva for medical and dental research, Pickering Laboratories, Inc. USA). За целта оригиналният калибратор към кита е разтворен в 2 ml дейонизирана вода до крайна концентрация 300 UCarr. Поради големия вискозитет, артифициалната слюнка се наложи да бъде разрежена предварително с дейонизирана вода в съотношение 1:1. За построяването на калибрационната графика са използвани седем калибратора, получени чрез съответно разреждане на оригиналния калибратор с разредената артифициална слюнка с цел постигане на област на клинично значими стойности – референтна и патологични (30, 50, 75, 100, 150, 200 и 300 UCarr). С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания при стриктно спазване на процедурата, указана от производителя. Графичната зависимост между концентрацията на ROS и съответната Δ Абсорбция/min (фиг.1) се описва със следното регресионно уравнение: $y=0.0001663*x+8.632e-006$, където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал (отчетената абсорбция). Коефициентът на корелация (r^2), мярка за линейността на метода е 0.9992.



Фигура 1. Калибрационна графика за определяне на ROS с помощта на d-ROMs тест

Откриваемият минимум (LOD) на d-ROMs е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби и наклона на калибровъчната графика (slope). LOD е изчислен по формулата:

$LOD = \frac{3.3 \cdot SD}{slope}$, и е равен на 3.3 UCarr. Границата на количествено определяне (LOQ) се дефинира като сигнал, надвишаващ десетократно фоновият шум и възлиза на 9.9 UCarr.

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода е използван контролен материал, предоставен от производителя – Low Control (Diacron International, Italy) с таргентна концентрация 160 UCarr, както и материал с двукратно по-ниска стойност, приготвен чрез разреждане 1:1 на гореспоменатия контролен материал с разредената артифициална слюнка (с таргентна концентрация 80 UCarr, попадащи в линейния диапазон на метода). Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни измервания за всяка от горепосочените концентрации. Възпроизводимостта от ден в ден е определена със същите контролни материали, измерени в рамките на 21 работни дни. Точността е оценена чрез размера на относителната грешка (D%), а достоверността на метода е определена с помощта на метода на стандартната добавка.

Аналитичната надеждност на метода, оценена чрез възпроизводимостта, точността и аналитичния добив, е представена на Таблица 1 А, В, С и D.

Таблица 1. Аналитична надеждност на d-ROMs тест в слюнка.

C [UCARR]	RSD%	C [UCARR]	RSD%	C [UCARR]	D%
160	2.1	160	3.9	160	2.8
80	4.8	80	5.5	80	5.2

A
B
C

Добавена концентрация [UCARR]	Намерена концентрация [UCARR]	Аналитичен добив (%)
50	45	92
100	96	96
150	155	103

D

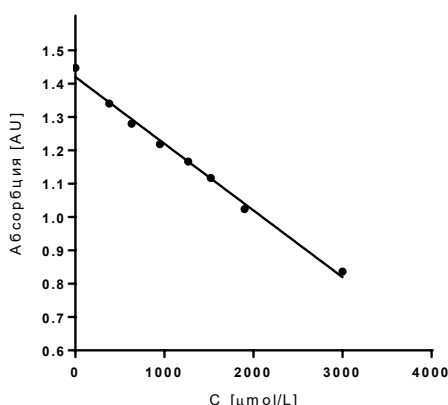
A. Възпроизводимост в серия. B. Възпроизводимост от ден в ден.

C. Точност на метода. D. Аналитичен добив

1.2.2. Валидиране на SAT тест – метод за определяне на антиоксидантния капацитет на слюнката

За определяне на общия АОС на слюнка е използван SAT тест, разработен от H&D srl Parma, Italy за биологичен материал слюнка. Линейността на метода, според производителя, е от 400 $\mu\text{mol/L}$ до 6000 $\mu\text{mol/L}$, а референтните граници за слюнка са 1000÷1500 $\mu\text{mol/L}$. За целите на добрата лабораторна практика, въпреки че тестът е разработен за слюнка, ние го валидирахме при нашите лабораторни условия, спазвайки изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025 за валидация на методи на изпитване.

За целта са използвани серия от специфични калибратори, изготвени с помощта на разрежена артифициална слюнка (Artificial saliva for medical and dental research) и оригинален калибратор от кита на производителя с таргетна концентрация 1900 $\mu\text{mol/L}$. Освен това е използван и допълнителен материал (High Control, Diacron International, Italy) с таргетна концентрация 3000 $\mu\text{mol/L}$ като калибратор, осигуряващ възможност да се провери линейността във високата концентрационна област. Така за построяването на калибрационната графика са използвани общо седем калибратора (380, 633, 950, 1267, 1520, 1900 и 3000 $\mu\text{mol/L}$). С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания при стриктно спазване на процедурата, указана от производителя. Графичната зависимост между концентрацията на АОС и аналитичния сигнал е обратнопропорционална (фиг. 2) и е описана със следното регресионно уравнение: $y = -0.0002 \cdot x + 1.42$, където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2), мярка за линейността на метода е 0.9937.



Фигура 2. Калибрационна графика за определяне на АОС с помощта на SAT теста

Откриваемият минимум (LOD) на SAT е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби и наклона на калибровъчната графика (slope). LOD е изчислен по формулата: $LOD = \frac{3.3 \cdot SD}{slope}$, и е равен на 163 $\mu\text{mol/L}$. Границата на количествено определяне (LOQ) възлиза на 489 $\mu\text{mol/L}$.

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода са използвани два контролни материала (Diacron International, Italy) със съответни таргетни концентрации: 940 $\mu\text{mol/L}$ (Low Control) и 3000 $\mu\text{mol/L}$ (High Control), покриващи нормалната и патологична област. Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни измервания за всяка от горепосочените концентрации. Възпроизводимостта от

ден в ден е определена със същите контролни материали, измерени в рамките на 21 работни дни. Точността е оценена чрез размера на относителната грешка (D%), а достоверността на метода е определена с помощта на стандартната добавка. Аналитичната надеждност на метода, оценена чрез възпроизводимостта, точността и аналитичния добив, е представена на табл. 2 А, В, С, D.

Таблица 2. Аналитична надеждност на SAT тест в слюнка

C [$\mu\text{mol/L}$]	RSD%	C [$\mu\text{mol/L}$]	RSD%	C [$\mu\text{mol/L}$]	D%
940	2.4	940	4.0	940	3.0
3000	2.0	3000	1.9	3000	2.5

A
B
C

Добавена концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Намерена концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Аналитичен добив %
500	472	94
1000	962	96
1500	1564	104

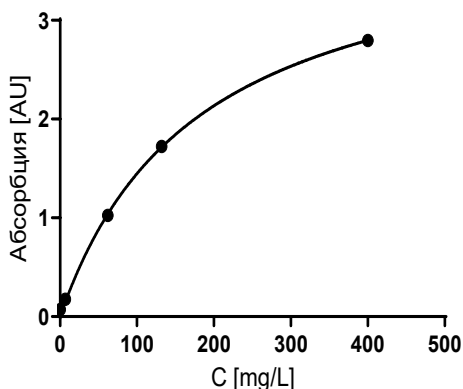
D

*A. Възпроизводимост в серия. B. Възпроизводимост от ден в ден.
C. Точност на метода. D. Аналитичен добив*

1.2.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин IgA

Изследването на sIgA е осъществено при стриктно спазване инструкциите на производителя (DiaMetra, Italy) с готов търговски ELISA кит, предназначен и валидиран за слюнка. За определяне линейността на метода са използвани включени в кита серия от калибратори (0, 6.9, 62, 132, 400 mg/L) и сертифициран контролен материал, специфични за съответния лот. С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания.

Графичната зависимост между концентрация на sIgA и аналитичен сигнал (фиг.3) се описва със следното нелинейно регресионно уравнение: $y=0.1514*x/(15.11+x)$, където x е концентрацията на съответния калибратор, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2) е 0.9988. При работа с кита сме разчитали на данните на производителя относно LOD и LOQ, които са съответно 0.5 mg/L и 1 mg/L, линейността на метода е от 5 до 600 mg/L, а определените референтни граници са 40÷170 mg/L.



Фигура 3. Калибрационна графика за определяне на sIgA

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода е използван контролен материал с концентрация 75.3 mg/L ($53.6 \div 113.7$), принадлежащ към кита (DiaMetra, Italy), а за оценка на достоверността на метода е определена с помощта на метода на стандартната добавка. Аналитичната надеждност на метода, оценена чрез възпроизводимостта, точността и аналитичния добив, е представена на табл. 3 А, В, С и D.

Таблица 3. Аналитична надеждност на sIgA в слюнка

C [mg/L]	RSD%	C [mg/L]	RSD%	C [mg/L]	D%
73.5	3.4	73.5	4.8	73.5	3.1

A B C

Добавена концентрация [mg/L]	Намерена концентрация [mg/L]	Аналитичен добив %
33.0	31.0	94
80	77.8	97

D

A. Възпроизводимост в серия. B. Възпроизводимост от ден в ден.

C. Точност на метода. D. Аналитичен добив

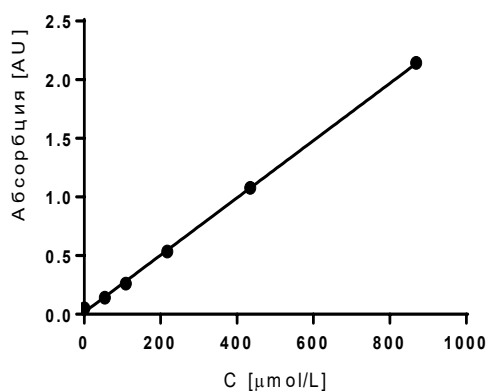
1.2.4. Валидиране на метод за изследване на нитрити в слюнка

За изследване на нитритите е използван колориметричен тест Nanocolor Nitrite (Macheray-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany), предназначен за изследване и контрол на нитрити в питейни води, чиито стойности са многократно по-ниски по хигиенни изисквания в сравнение с физиологичните стойности на нитрити в слюнка, събрана при стандартни условия, т.е. сутрин на гладно и без прием в предходните 24 часа на храна, богата на нитрати. По литературни данни референтните граници (РГ) за нитрити в слюнка варират между $25 \div 250 \mu\text{mol/L}$ (Björne et al., 2004; Hohensinn et al., 2016).

За целите на проучването тестът е валидиран за биологичен материал слюнка, като предварително са изпробвани различни съотношения проба/реактиви, за да се установи подходяща работна процедура. Като резултат е възприет следният начин на работа: към 500 μL R1 (съдържащ оцетна киселина и сулфанилова киселина) се добавя 100 μL слюнка и 500 μL R2 (оцетна киселина и 1- нафтиламин) и сместа се хомогенизира добре. Пробите се инкубират за 10 минути на стайна температура. Развива се цветна реакция, чиято абсорбция се отчита срещу празна проба дестилирана вода и сляпа проба (слюнка без прибавка на стандартен разтвор) при $\lambda=520\text{ nm}$. Измерването се осъществява на полуавтоматичен спектрофотометър Free Carpe diem (Diacron, Italy).

За определяне линейността на метода е използван сертифициран стандарт воден разтвор на нитрити с таргетна концентрация 200 mg/L (VWR Rrolabo Chemicals, Belgium). За целите на проучването е избрано да се работи в мерни единици по SI системата, т.е. таргетната концентрация на стандарта е 4348 $\mu\text{mol/L}$, от който са приготвени серия специфични калибратори (0.0, 54.0, 108.7, 217.4, 434.8 и 869 $\mu\text{mol/L}$), като покриват както референтните, така и патологичните стойности. Те са изготвени с матрица сборна слюнка (събрана от 20 здрави доброволци) и добавка на стандартен разтвор.

Графичната зависимост между концентрация на нитритите и аналитичния сигнал (фиг.4) се описва със следното регресионно уравнение: $y=0.002441*x+0.01652$, където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2) е 0.9994.



Фигура 4. Калибрационна графика за определяне на нитрити в слюнка

Откриваемият минимум (LOD) на нитрити е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби и наклона на калибровъчната графика (slope). LOD е изчислен по формулата:

$LOD = \frac{3.3 * SD}{slope}$, и е равен на 3.1 $\mu\text{mol/L}$. Границата на количествено определяне (LOQ) възлиза на 9.3 $\mu\text{mol/L}$.

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода също са изготвени контролни материали с матрица слюнка и добавяне на стандартен разтвор с крайни концентрации 58.7, 96.5, 144.8 и 217.4 $\mu\text{mol/L}$. Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни измервания за всяка от горепосочените концентрации. Възпроизводимостта от ден в ден е определена със същите контролни материали, измерени в рамките на 21 работни дни. Точността е оценена чрез размера на относителната грешка, а достоверността на метода е определена с помощта на метода на стандартната добавка. Аналитичната надеждност на метода, оценена чрез възпроизводимостта, точността и аналитичния добив, е представена на Таблица 4 А, В, С, D.

Таблица 4. Аналитична надеждност на нитрити в слюнка

С [$\mu\text{mol/L}$]	RSD%	С [$\mu\text{mol/L}$]	RSD%	С [$\mu\text{mol/L}$]	D%
58.7	3.9	58.7	4.5	58.7	4.2
96.5	3.5	96.5	3.6	96.5	3.5
144.8	2.7	144.8	2.8	144.8	3.3
217.4	2.4	217.4	2.6	217.4	2.9

А
В
С

Добавена концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Намерена концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Аналитичен добив %
108.7	103.3	95
217.4	210.0	97
434.8	428.0	98

D

А. Възпроизводимост в серия. В. Възпроизводимост от ден в ден.

С. Точност на метода. D. Аналитичен добив

Обсъждане на резултатите:

При оптимизирането и валидирането на методи за количествено определяне на dROMs, SAT, sIgA, и нитрити в слюнка при нашите лабораторни условия са спазени всички изисквания на **Стандарт БДС EN ISO/IEC 17025**, спомагащ компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране на количествени лабораторни методи. Изследваните показатели показват висока аналитична надеждност, съпоставима с тази на утвърдени спектрофотометрични методи, рутинно използвани в клинично-лабораторната дейност. Това гарантира пригодността им за осигуряване на качествени и достоверни резултати за целите на настоящето научно проучване.

2. Проучване на биологичните вариации на подбрани биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтния им интервал

Възможността един лабораторен параметър да се окаже полезен биомаркер с висока диагностична надеждност (способен да разграничава добре болест от здраве) изисква доброто охарактеризиране на биологичните му вариации (Ebersole et al., 2013). Съществени фактори, определящи биологичната вариация са пол, възраст и тютюнопушене.

2.1. Влияние на пол и възраст

За изучаване вариациите на подбраните слюнчени показатели, индивидите от контролната група (n=186) са разделени по пол (81 жени и 105 мъже) и по възраст. Възрастовият диапазон на участниците е от 20 до 64 години. Индивидите са обособени в четири възрастови декади както следва: 20÷30 год. (n=30); 31÷40 год. (n=69); 41÷50год. (n=52) и 51÷64 години (n=35).

Изследваните слюнчени биохимични параметри и клетъчни елементи в различните възрастови декади са показани в Таблицы 5 А и 5 В.

Таблица 5А. Възрастови вариации на биохимичните анализи в слюнка

Показател (мерна единица)	20÷30 години (mean±SD)	31÷40 години (mean±SD)	41÷50 години (mean±SD)	51÷64 години (mean±SD)	p value
sIgA [mg/L]	102.92±26.52	106.13±74.62	107.20±13.80	111.37±29.35	ns
sAA [U/mL]	63.746±82.91	60.035±86.62	58.897±77.41	57.374±88.23	ns
TP [mg/L]	642.90±174.3	770.63±292.1	778.36±494.0	798.47±448.9	ns
ALB [mg/L]	46.26±21.51	50.87±38.00	53.63±19.83	57.72±28.56	ns
UA [μmol/L]	217.23±48.56	220.51±51.33	223.42±65.98	225.59±40.71	ns
Nitrite [μmol/L]	56.05±34.04	100.47±94.30	105.46±147.4	128.82±171.1	ns
LDH [U/L]	150.41±85.13	159.33±65.93	151.11±57.71	148.41±89.76	ns

Сравнителният анализ на различията на биохимичните показатели по възраст е осъществен с One way ANOVA

Таблица 5В. Възрастови вариации на клетъчните елементи в слюнка

Видове клетки [cells/μL]	20÷30 години (mean±SD)	31÷40 години (mean±SD)	41÷50 години (mean±SD)	51÷64 години (mean±SD)	p value
RBC	73.07±51.49	77.95±44.90	80.83±43.43	87.14±53.18	ns
WBC	247.29±251.2	256.77±234.7	261.42±195.3	282.55±245.5	ns
EC	414.81±286.7	450.11±229.0	570.86±227.7	602.14±254.6	ns
Bacteria	2676.1±787.7	2858.24±1243	2938.08±1097	3016.86±1061	0.023

Сравнителният анализ на различията на клетъчните елементи по възраст е осъществен с One way ANOVA.; EC – епителни клетки

Влиянието на пола върху изследваните слюнчени биохимични параметри и клетъчни елементи е отразено в Таблицы 6А и 6В

Таблица 6А. Полови вариации на биохимичните анализи в слюнка

Показател (мерна единица)	Мъже (mean±SD)	Жени (mean±SD)	<i>p</i> value
sIgA [mg/L]	105.67±43.41	108.14±20.18	ns
sAA [U/mL]	61.11±58.05	58.92±59.69	ns
TP [mg/L]	753.04±407.9	742.14±341.6	ns
ALB [mg/L]	50.91±26.26	53.30±33.77	ns
UA [μmol/L]	225.34±57.24	217.14±47.42	ns
Nitrite [μmol/L]	103.41±74.17	90.22±54.07	ns
LDH [U/L]	147.23±57.78	157.40±82.25	ns

Сравнителният анализ е осъществен с *t*-test за показатели с Гаусово разпределение на стойностите и с помощта на Mann-Whitney за показатели с негаусово разпределение

Таблица 6В. Полови вариации на клетъчните елементи в слюнка

Видове клетки [cells/μL]	Мъже (mean±SD)	Жени (mean±SD)	<i>p</i> value
RBC	81.32±43.07	75.29±38.99	ns
WBC	264.42±151.6	257.39±140.5	ns
EC	493.18±142.3	525.66±214.1	ns
Bacteria	2870.91±1669	2873.67±1756	ns

Сравнителният анализ е осъществено с помощта на Mann-Whitney test

2.2. Влияние на тютюнопушенето

Ефектът от тютюнопушенето върху слюнчения състав на цяла нестимулирана слюнка е оценен в контролната ни група. Разпределението на изследваните лица от тази група според употребата на тютюневи изделия е представено на таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на лицата от контролната група според тютюнопушенето

Групи	Пушачи n (%)	Непушачи n (%)	Общо n (%)
Мъже	45 (42.9%)	60 (57,1%)	105 (56,5%)
Жени	32 (39.5%)	49 (61.5%)	81 (43,5%)
Общо	77 (41.4%)	109 (58.6%)	186 (100%)

На базата на събраната предварително информация, средната продължителност на тютюнопушенето е 9.2 години (диапазон 1÷25), а средната

дневна консумация – 10 цигари (диапазон 5÷20). Изследваните слюнчени показатели при пушачи и непушачи са дадени на таблица 8.

Таблица 8. Влияние на тютюнопушенето върху саливарните параметри при лицата от контролната група

Показател (мерна единица)	Пушачи (mean±SD)	Непушачи (mean±SD)	<i>p</i> value
UA [$\mu\text{mol/L}$]	199±37.73	231±47.74	0.004
sIgA [mg/L]	101.15 ±21.61	118.62±24.58	0.031
TP [mg/L]	822.9±323.7	681.8±324.9	0.004
ALB [mg/L]	57.44±30.26	49.57±25.06	0.043
LDH [U/L]	172±83.87	134.8±35.53	<0.0001
sAA [U/mL]	56.59±50.78	63.91±77.52	ns
Nitrite [$\mu\text{mol/L}$]	123.3±108.3	72.4±41.89	0.008
RBC [cells/ μL]	85.83±47.30	71.94±35.61	0.024
WBC [cells/ μL]	307.3±221.7	217.8±111.6	0.0004
EC [cells/ μL]	592±266.0	428±167.8	<0.0001

Сравнителният анализ е осъществен с t-test за показатели с Гаусово разпределение на стойностите и с помощта на Mann-Whitney за показатели с негаусово разпределение.

Обсъждане на резултатите

Важните функции, които осъществява слюнката по отношение на цялостното човешко здраве, се обуславят от нейния качествен състав, както и от рН, вискозитета и буфериращата ѝ способност (Alshahrani et al., 2019). Всички фактори, които могат да повлияят върху скоростта на слюнчената секреция, съответно променят концентрацията на анализите в нея.

Децата се раждат със стерилна устна кухина и още в първите дни от живота им, върху езика и устната лигавица се образуват комесални микробни общности, които играят роля при формиране на неспецифичния и специфичен лигавичен имунитет и поддържане на оралната хомеостаза. Така например секреторният IgA и sAA са почти неоткриваем при раждането и постепенно концентрациите им се повишават, като към 10-годишна възраст се приближават до тези на възрастните. Увеличението на тези показатели в ранна възраст се обяснява с разширяване на хранителното меню, въвеждането на твърда храна, както и с поникване на зъбите.

Резултатите в настоящото проучването върху здрави лица показват слабо изразена тенденция за постепенно покачване на концентрациите на sIgA, LDH, нитрити, ALB, TP и UA в наблюдаваните четири възрастови групи, макар и различията помежду им да не са статистически значими. Най-често тези разлики се свързват с промяна в скоростта на слюнчената секреция, която намалява с възрастта. Докато относно sAA се наблюдава слаба тенденция за намаление на активността ѝ в нестимулирана слюнка и най-високи стойности са получени при

най-младата група (20÷30 години), съответстващо и на литературните данни (Arhakis et al., 2013). Известно е, че sAA се влияе силно от диетичния режим (Mandel and Breslin, 2012). Употребата на повече зърнени храни стимулира секрецията на ензима. Според нас, предпочитанието към бързия начин на хранене при младите хора с употребата на повече тестени изделия може да е причина за наблюдаваните незначимо по-високи стойности на sAA в тази възрастова група. Друга причина за намаляване на нивата на ензима е, че с възрастта намалява активната ацинарна структура и тя се замества със съединителна или мастна тъкан (Xu et al., 2019).

Редица автори съобщават, че жените имат по-нисък слюнчен дебит, който може да се дължи, както на по-малкия обем на жлезите, така и на по-ниския индекс на телесна маса (Fenoll-Palomares et al., 2004). Вероятно това е причина за наблюдаваните и в нашето проучване по-ниски стойности на редица параметри като UA, sAA и нитрити при жените в сравнение с мъжете, но те не се статистически значими. Слюнчените жлези и оралният епител експресират рецептори за естрогени и за прогестерон, като е доказано хормоналното влияние върху скоростта на слюнчения поток (в посока на намаление) и състава на слюнката (Valimaa et al., 2004). Това обяснява наблюдаваните по-високи стойности на белтъчните компоненти (sIgA, ALB, TP) поради относително нарастване на концентрацията им в слюнката.

Относно клетъчният състав също не се наблюдават съществени възрастови и полови вариации в изследваните клетъчни елементи в нестимулирана слюнка от здрави лица. Възрастта се оказва единствено съществен фактор по отношение броя на бактериалните клетки. Нашето проучване установи статистически значимо увеличение на бактериите с възрастта ($p=0.0234$), като при сравнението между отделните групи посредством One way ANOVA с корекция по Bonferroni, също се намери сигнификантно различие между индивидите от първа група спрямо тези от трета и четвърта (съответно $p=0.0177$ и $p=0.006$). Това вероятно се дължи на променения стоматологичен статус с нарастване на възрастта напр. наличие на чужди тела като коронки, мостове, частични протези, които създават условия за натрупване на хранителни остатъци и благоприятна среда за бактериалната колонизация. При лоша устна хигиена повишеното количество бактерии води до инфилтрация на макрофаги в устната мукоза и стимулира производството на нитрити от постъпващите с храната нитрати. Нашите резултати показват нарастващи стойности на нитрити в слюнка с възрастта. Интересно е, че още във втората възрастова група се установява почти двукратно увеличение на нивата, макар и все още статистически незначимо, вероятно поради по-големите девиации в стойностите. Най-високи концентрации на нитритите се

установяват при лицата от последната възрастова група, като различията спрямо тези от първа декада са сигнификантни (тест One way ANOVA с корекция по Bonferroni $p=0,0281$).

В настоящото проучване се наблюдава тенденция за увеличаване на ЕС в различните възрастови групи, като се установява статистически значима разлика ($p=0.0453$) в броя им между младите от първата група (20-30 г.) спрямо индивидите от четвъртата група (50-64 г.). Епителът на устната лигавица е чувствителен към ефекта на женските полови хормони като различни периоди в живота на жената, свързани с промените в хормоналния ѝ статус (пубертет, бременност и менопауза) водят до изменения в него (Dhaliwal et al., 2015). Получените от нас данни обаче показват липса на полови различия относно броя на видове клетки. Вероятна причина за това, би могло да бъде и фактът, че изследваната група жени не е еднородна, а включва жени в репродуктивна възраст, в перименопауза и такива в менопауза.

Слюнката е първият флуид, с който цигареният дим влиза в пряк контакт. Тютюнопушенето, действа механично и химично върху мукозата, води до промяна в йонния, протеиновия състав, буферния капацитет и рН на слюнката. Така се променя и балансът в популациите на комесалните микроорганизми, водещ до дисбактериоза. Цигареният дим съдържа над 4000 различни химични съединения (ароматни амини, нитрозамини, оксиданти (ROS), радиоактивни елементи (^{210}Po), които унищожават защитните макромолекули, ензими и протеини в слюнката, в резултат на което лигавицата става податлива, както на възпалителни, така също и на дегенеративни промени (Söder et al., 2002). Настоящото проучване установи статистически значими различия между пушачи и непушачи за всички биохимични параметри в нестимулирана слюнка с изключение sAA. Повишените нива sAA са типичен пример за влиянието на симпатиковата нервна система (стрес или бета миметична стимулация) върху слюноотделянето (Allen, 2014). Първоначалните ефекти при всеки начинаещ пушач са повишена активност на слюнчените жлези и секрецията на sAA, като дългосрочното въздействие на никотина обратно води до намалена скорост на слюнчения поток. Независимо от това, че нашето проучване не установява сигнификантна разлика в активността на ензима между пушачи и непушачи, се забелязва слабо изразена тенденция към по-ниски нива при пушачите. Установено е, че дългосрочното излагане на тютюнев дим причинява намаляване на зимогенните гранули и вакуолизация на слюнчените ацинарни клетки. Възможно е ненаситените алдехиди и други компоненти в цигарения дим да действат токсично, като водят до структурни и функционални изменения в ензима и инхибиране на неговото действие.

Като вреден рисков фактор, тютюнопушенето увеличава стойностите на тези от изследваните биохимични показатели, които се свързват с възпалителни и некротични тъканни промени, като LDH и нитрити, както и относително нарастване нивата на TP и ALB, поради влиянието върху скоростта на слюнчената секреция. Обратно, наблюдава се намаляване на стойностите на тези от изследваните биохимични показатели, които осигуряват специфичната и неспецифична имунна защита на оралната мукоза, такива като sIgA и UA.

Промените в устния епител увеличават пропускливостта на лигавицата, което води до проникване на повече химични и канцерогенни субстанции в локалните тъкани. Тютюнопушенето се оказва определящ фактор и по отношение на клетъчните елементи в слюнка. Токсичното и провъзпалително действие на химичните субстанции в цигарения дим води до сигнификантно по-високи стойности на всички изследвани клетки в нестимулирана слюнка.

2.3. Референтни граници

Един от недостатъците на саливарната диагностика е отсъствието на единни референтни граници за редица изследвани показатели. Една от задачите на това научно проучване е да бъдат установени референтни граници, съобразени със специфични регионални и традиционни условия на бит и култура. Определените от нас РГ са съобразени с препоръките на IFCC, както относно стандартизиране на процедурата по пробовземане, така и подбора на референтната група, избор на аналитични и статистически методи. Подборът на индивидите от референтната група (n=186) е извършен на случаен принцип – от преминаващите във ВМА-Варна лица, подлежащи на рутинен годишен профилактичен преглед или експертна оценка, без субективни и обективни отклонения (зdravi индивиди) и нормален стоматологичен статус. Според получените от нас данни при изследване на някои биологични вариации не се откриха сигнификантни статистически различия по възраст и пол, поради което референтната ни група не се подраздели на подгрупи. На всяко лице са обяснени стандартизираните правила, които трябва да спазва при събирането на слюнка. Взета е и информация, свързана с тютюнопушенето. Всеки биологичен материал е съхраняван и обработван по описана процедура, според изискванията на добрата лабораторна практика и според целите на научното проучване. Резултатите са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов за типа на разпределението на резултатите и се избра подходящ статистически метод за изчисление на съответните референтни граници. Показатели като TP, ALB, UA и sIgA показват Гаусово разпределение на данните и се използва параметричен анализ за изчисление на референтните интервали. Полученият тип на разпределение на резултатите за показатели sAA, LDH и нитрити, както и за клетъчните елементи

не е Гаусово, което наложи логаритмична трансформация и повторен анализ на данните. За изчисление на референтния интервал на показателите в слюнка са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от средната стойност (mean) \pm две стандартни отклонения (SD).

Съпоставянето на определените от нас референтни граници на изследваните биохимични показатели в слюнка с данни от литературни източници, чийто подход на изследване на слюнката е сравнително близък до нашия са представени в таблица 9.

Таблица 9. Референтни граници на изследваните от нас биохимични параметри в слюнка, сравнени с данни от литературата

Показател (мерна единица)	Определени от нас РГ в нестимулирана слюнка	РГ по литературни данни
UA [$\mu\text{mol/L}$]	145 \div 320	70 \div 320 ^{1*} 117 \div 328 ²
sIgA [mg/L]	67.8 \div 144.6	40 \div 170 ³ до 190 ⁴
LDH [U/L]	96 \div 360	360 \div 430 ⁵ 905 \div 1911 ⁶
TP [mg/L]	410 \div 1177	40 \div 1410 ⁶ 170 \div 1560 ^{1*}
ALB [mg/L]	29.4 \div 82.4	58 \div 115 ⁷ 38 \div 165 ⁶
Nitrite [$\mu\text{mol/L}$]	25 \div 121	75 \div 117 ⁸ 56.5 \div 78.1 ⁶
sAA [U/mL]	17.62 \div 79.95	23 \div 148 ⁹ 39 \div 64 ⁴
pH	6.0 \div 7.5	5.95 \div 7.55 ⁷
SG	1.005 \div 1.015	1.003 \div 1.008 ⁷

Литературни източници: ¹Nunes et al., (2015); ²Soukup et al., (2012), ³брошура DiaMetra;

⁴Бреценко и Быков (2018); ⁵Nagler et al., (2001); ⁶Bel'skaya et al., (2020);

⁷Shaila et al., (2013); ⁸Tatarczak-Michalewska et al., (2019); ⁹Yang et al., (2015).

. *Литературни източници, чиито резултати са получени при изследване на стимулирана цяла слюнка

Съпоставянето на определените от нас референтни граници на изследваните клетъчни елементи в слюнка с данни от литературата са представени в табл.10.

Таблица 10. Референтни граници на клетъчните елементи в слюнка, сравнени с данни от литературата

Показател [cells/ μ L]	Определени от нас РГ в нестимулирана слюнка	РГ по литературни данни
RBC	14÷156.0	123÷3388 ^{1*} 10÷1043 ^{2*}
WBC	58÷451.0	257÷5142 ^{1*} 224÷3166 ^{2*} 110÷1364 ³ 107÷227 ⁴ 331÷975 ⁵ 100-400 ⁶
EC	104 ÷698	162÷4191 ^{1*} 192÷2106 ^{2*} 473÷1130 ⁵ до 400 ⁶
Bact	1810÷5115	3785÷37249 ^{1*} 1678÷80199 ^{2*}

Литературни източници: ¹Aps et al., (2002); ²Coopman et al., (2018); ³Calouius, (1958);

⁴Vidovic et al., (2011); ⁵Klein (1962); ⁶Dorion (2016); *стимулирана слюнка, FCM

Обсъждане

Едни от проблемите, свързани с въвеждането на слюнката като допълнителен биологичен материал в рутинната лабораторна практика е отсъствието на единни референтни граници за редица биохимични показатели и клетъчни елементи. Големите вариации в резултатите, получени от различни литературни източници често се дължат на използвания метод на изследване, от броя на референтните индивиди и от типа на слюнчената проба. Твърде ниските концентрации на някои от анализите в слюнка, в сравнение с нивата им кръвта, налага избор на подходящи за целта чувствителни методи.

От направеното сравнение с литературните данни се установява, че определените от нас референтни диапазони на изследваните биохимични показатели в нестимулирана слюнка са близки до референтните граници от литературни източници, в които е съобщено както за стандартизирано вземане на слюнка, така и за методи, идентични на използваните от нас и съобразени с особеностите на слюнката като биологичен материал. Незначителните различия в биохимичните параметри вероятно се дължат на особености на нашата референтна група, отразяващи специфични регионални и традиционни условия на бит и култура.

Относно клетъчните елементи съпоставянето на резултатите ни с данни от литературата е затруднено, тъй като в относително ограничения брой литературни източници се откриват множество различия относно типа на слюнката, начинът ѝ на събиране, методът на броене, както и броят и характеристиките на изследваните индивиди. В последните десетилетия се предпочита автоматичното

изброяване на клетъчни елементи в слюнка пред мануалното им камерно броене, понеже последното е обременено от повече грешки. Но за целта се използват разнообразни анализатори, използващи различни принципи на броене и основно в стимулирана слюнка. Така сравнението между нашите данни и тези в литературата не може да бъде коректно направено.

3. Проучване на биологичната вариация и определяне на референтния интервал на маркери, оценяващи оксидативния стрес в слюнка и серум от здрави лица.

Слюнката се явява първа линия на защита срещу медиран от свободните радикали оксидативен стрес (ОС), тъй като дъвкателният процес и усвояването на приетите храни стимулират различни реакции, включително пероксидация (Battino et al., 2002). Слюнката притежава естествена антиоксидантна защита, включваща както ендогенни, така и -екзогенни антиоксиданти, които имат решаващо значение за нормалния редокс-баланс в клетките.

3.1 Влияние на пол и възраст върху показателите за ОС в слюнка

При изследване на показателите за налични реактивни кислородни форми (dROMs тест) и антиоксидантния капацитет (SAT тест) в нестимулирана слюнка от индивидите, формиращи контролната ни група са установени следните стойности (таблици 11, 12)

Таблица 11. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в слюнка в зависимост от пола

Показател (мерна единица)	Мъже (mean±SD)	Жени (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	63.89±5.216	62.82±6.740	ns
SAT [µmol]	1069±236.1	1052±325.4	ns

Сравнителният анализ е осъществен с *t*-test

Таблица 12. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в слюнка в зависимост от възрастта

Показател (мерна единица)	20÷30 години (mean±SD)	31÷40 години (mean±SD)	41÷50 години (mean±SD)	51÷64 години (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	59.40±6.55	63.46±4.35	65.08±6.30	68.00±2.730	0,0013
SAT [µmol]	1133±154.9	1082±161.8	1042±209.9	987.0±54.72	ns

Приложен е *One way ANOVA*

dROMs – реактивни кислородни метаболити; *SAT* слюнчен антиоксидантен тест

3.2 Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в слюнка

Таблица 13. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на *слюнчените* нива на оксидативен стрес при лицата от контролната група

Показател (мерна единица)	Пушачи (mean±SD)	Непушачи (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	67.23±3.32	58.79±5.49	<0.0001
SAT [µmol]	838.6±149.3	1240±265.5	<0.0001

Сравнителният анализ е осъществен с *t-test*

3.3 Влияние на пол и възраст върху показателите на ОС в серум

При изследване на показателите за оценка на оксидативен стрес посредством dROMs тест и BAP тест в серум от индивидите, формиращи контролната ни група са установени следните стойности (таблици 14 и 15).

Таблица 14. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в серум в зависимост от пола

Показател (мерна единица)	Мъже (mean±SD)	Жени (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	366.0±65.10	358.0±64.18	ns
BAP [µmol]	2667±392.5	2594±306.6	ns

Сравнителният анализ е осъществен с *t-test*

Таблица 15. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в серум в зависимост от възрастта

Показател (мерна единица)	20÷30 години (mean±SD)	31÷40 години (mean±SD)	41÷50 години (mean±SD)	51÷64 години (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	348.2±58.28	358.1±54.80	383,7±54,38	415,7±90,59	0,0207
BAP [µmol]	2777±264.6	2645±291.4	2764±536.2	2675±304.5	ns

Приложен е *One way ANOVA*

dROMs – реактивни кислородни метаболити; BAP биологичен антиоксидантен потенциал

3.1 Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в серум

Таблица 16. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на *серумните* нива на оксидативен стрес при лицата от контролната група

Показател (мерна единица)	Пушачи (mean±SD)	Непушачи (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	405.8±78.22	348.8± 44.91	<0.0001
BAP [µmol]	2672±346.8	2647±250.6	ns

Сравнителният анализ е осъществен с *t-test*

Обсъждане

При изследване влиянието на фактора пол върху параметрите за ОС в слюнка в настоящото проучване не се наблюдават статистически значими различия. За разлика от нас, Lettrichová и сътр. (2015) и Sculley and Langley-Evans (2003) докладват за значимо по-ниски стойности на антиоксидантния капацитет (АОС) в слюнката, изследван с други два теста – тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) и желязо редуцираща способност на плазмата (FRAP) при млади жени в сравнение с тези, установени при мъже на съответната възраст. В изследването на Benedetti и сътр. (2014) АОС, изследван посредством SAT теста, също е значимо по-висок при мъжете спрямо жените. При това проучване обаче участват млади индивиди във възрастов диапазон 18-40 години за разлика от нашата група, която е в диапазона 20-64 години. В нашето проучване факторът възраст доминира над фактора пол върху изследваните параметри, тъй като е установено значимо нарастване на стойностите на dROMs при лицата от трета (тест One way ANOVA с корекция по Bonferroni, $p=0.0362$) и четвърта ($p=0.0004$) възрастови групи (41÷64 г.) спрямо тези от първа група (20÷30 г.). Логично е да се наблюдава и намаление на АОС с възрастта, което се установи при нашето проучване: стойностите, получени посредством SAT теста са по-високи в първа възрастова група, сравнени с тези от последната възрастова група ($p=0.0017$).

Подобни данни се установяват и при *серумните нива* на показателите на оксидативен стрес със слабо и незначимо изразени вариациите по отношение на пола. За разлика от нас други изследователи установяват значими различия (Ide et al., 2002; Kander et al., 2017). Така напр. в обзора на Kander (2017) се отчитат по-ниски нива на АОС и по-високи нива на ROS при мъжете спрямо тези, установени при жени. Лансира се идеята, че при физиологични условия жените са по-малко податливи на оксидативен стрес. Това би могло да се дължи на приписваните антиоксидантни свойства на естрогена и/или на предизвиканата от него промяна в експресията/активността на антиоксидантните ензими, както и на повишена активност на NADPH-оксидазата при мъжете. Обратно, Brunelli и сътр. (2014), изследвайки здрави индивиди във възрастовия диапазон от 25 до 70 години ($n=195$) с dROMs тест и VAP тест, съобщават за значимо по-висока степен на ОС в серум при жените в сравнение с мъжете, но не откриват различия в АОС при двата пола. Bhatia и сътр. (2012) твърдят, че оксидативният стрес при жените се задълбочава с навлизане в менопаузата и е съпоставим с този при мъжете. Отчитайки разнопосочността на резултатите в литературата, относно половите различия по отношение на ОС, бихме могли да заключим, че полът не е определящ фактор, а по-скоро влияят фактори на околната среда и най-вече възрастта. Анализът на данните от нашето проучване показва постепенно

нарастване с възрастта на серумните нива на ROS, като различията между първата възрастова група и последната декада достигат статистическа значимост (тест One way ANOVA с корекция по Bonferroni, $p=0.0185$). Различни проучвания описват покачване нивата на ROS и съответно намаляване на AOC при възрастните хора, обявявайки ги като патогенетични фактори, играещи решаваща роля за сърдечно-съдови, хронични бъбречни заболявания, хронична обструктивна белодробна болест, невродегенеративни и онкологични заболявания (Andriollo-Sanchez et al., 2005; Liguori et al., 2018; Tan et al., 2018). Нашите данни съответстват на многобройните публикации в литературата за възрастово обусловения ОС. Вероятни причини, с които се прави опит да се обясни този факт е превалирането на хората с наднормено тегло и нарушен метаболизъм с напредване на възрастта, както и продължителното въздействие на вредни навици и различни неблагоприятни фактори на околната среда.

Хранителните навици, факторите на околната среда и начинът на живот също могат да оказват влияние върху слюнчения AOC. Употребата на алкохол и тютюнопушенето са важни вредни навици, водещи до покачване на реактивните кислородни форми и намаляване на AOC, както в слюнката, така и в серума (Peter et al., 2013). Цигареният дим притежава прооксидантни свойства, дължащи се на разнообразни токсини и оксиданти в него. Освен локалното действие на цигарения дим върху тъканите на храносмилателната и дихателната системи, общоприето е становището, че свободните радикали в цигарения дим действат върху целия организъм като потенцират пероксидацията на макромолекули като липидите в клетъчната мембрана, белтъци, нуклеинови киселини и стимулират провъзпалителни реакции (Valavanidis et al., 2009). Резултатите от настоящето проучване установи статистически значимо нарастване на оксидантите както в слюнка така и в серум и съответно значимо намаление на слюнчения AOC при пушачи в сравнение с непушачи. Прави впечатление, че не се наблюдава статистическо различие на серумният AOC при двете групи пушачи/непушачи (табл.16). Други проучвания също установяват, липса на значима разлика в серумния антиоксидантния капацитет при пушачи и непушачи, но доказват, че тютюнопушенето има статистически значим ефект върху количеството на генерираните ROS (Lykkesfeldt et al., 2004; Block et al., 2002).

За оценка на баланса оксиданти/антиоксиданти и развитието на оксидативен стрес са въведени редица индекси, като част от тях включват и показателите, получени посредством dROMs и BAP тестове. През 2015-та година Yamamoto и сътр. въвеждат модифицирано съотношение BAP/dROM (mOA), изчислено със следната формула: $mOA = \frac{BAP}{dROMs * 7.541}$. Определената от тях cut-off стойност е 1.0, като стойностите <1.0 са индикативни за намален антиоксидантен потенциал.

Използвайки този индекс, ние намираме, че при пушачи mOA е 0.87, а при непущачи mOA – 1.01, което е още едно потвърждение за негативната роля на тютюнопушенето за възникване и поддържане състояние на ОС при пушачите.

3.4 Определяне на референтни граници на показателите на ОС в слюнка и серум

Една от задачите в настоящото проучване бе определяне на референтни граници на използваните слюнчени и серумни показатели на ОС.

Таблица 17. Референтни граници на показателите за оксидативен стрес в слюнка

Показател (мерна единица)	Определени от нас РГ в нестимулирана слюнка	Референтни граници, посочени от производителя
dROMs [UCARR]	58÷70	–
SAT [μmol]	924.5÷1571	1000÷1500

**95% доверителен интервал*

Таблица 18. Референтни граници на показателите за оксидативен стрес в серум

Показател (мерна единица)	Определени от нас РГ в нестимулирана слюнка	Референтни граници, посочени от производителя
dROMs [UCARR]	252.4÷463.5	250÷300
BAP [μmol]	2210÷3400	>2200

**95% доверителен интервал*

Получените резултати са обработени статистически посредством теста на Колмогоров-Смирнов и се установи нормално Гаусово разпределение на данните, което определи използването на параметричен анализ за изчисление на референтните интервали. За изчисление на референтния интервал на показателите в слюнка и серум са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $\text{mean} \pm 2\text{SD}$.

В достъпната до нас литература липсват данни за определяне на ROS в слюнка с помощта на dROMs тест, освен тези, проучени в миши експериментални модели. Не открихме и данни за референтни граници на генерираните реактивни кислородни форми в слюнка и липсва възможност да направим сравнение на нашите данни с такива от други проучвания. Benedetti и сътр. (2014), валидирайки метода за антиоксидантен капацитет в слюнка (SAT), анализират 60 проби от здрави индивиди на възраст от 18 до 40 години. Те също установяват, че стойностите на показателя са нормално разпределени и варират в диапазона на 947÷1459 $\mu\text{mol/L}$. Въпреки, че нашите референтни индивиди формират по-широк възрастов диапазон (20÷64 години), е очевидно, че определените от нас стойности

на референтния интервал са твърде близки до тези, посочени както в проучването на Benedetti, така и спрямо дадените от производителя граници.

Измерените от нас серумни нива на АОС в референтната ни група отговарят на оптималните стойности, посочени от производителя. Що се отнася до стойностите на ROS в серум на референтните ни индивиди, е интересно да се отбележи, че средните им нива ($360,5 \pm 51.5$ UCARR) не попадат в нормалните граници, определени от производителя, а достигат патологични стойности, сочещи умерена степен на генериране на ОС. Определените от нас референтни граници отразяват национални и регионални особености на популацията, като вероятните причини за повишените нива биха могли да са следствие на различния начин на живот, на различни фактори на средата, както и на често срещаните вредни навици като тютюнопушене, употреба на алкохол и неправилно хранене, водещо до наднормено тегло. Друг интересен факт, който е необходимо да се подчертае е, че се срещат и други проучвания, чиито контролни групи са със стойности на ROS близки до нашите, също надскачащи определените от производителя на теста референтни граници, определени посредством с dROMs тест (Trotti et al., 2002; Fukui et al., 2011). В брошурата на теста липсват данни относно референтната група (брой изследвани лица, възраст, пол, критерии на включване и изключване), както и принципите за определяне на различните степени на тежест на ОС. Това затруднява сравнението на данни от различните проучвания с тези, предложени от производителя.

4. Проучване на корелативни връзки между изследваните слюнчени и серумни показатели

За да могат коректно да се интерпретират резултатите от изследваните анализи в слюнка, като алтернативна матрица на серум/плазма, трябва да се определят нормалните съотношения на концентрациите им в двата биологични материала. Според нормалните съотношения на концентрациите в слюнка/серум слюнчените анализи могат да бъдат класифицирани в **три категории** (Kang et al., 2018):

1. анализи, чиято слюнчена концентрация е **по-ниска** от тази в серума (напр. Na^+ , Mg^{++} , Cl^- , ALB, TP и др.) имат съотношение на концентрациите си в слюнка спрямо серум **по-малко от 0.5**
2. анализи, чиито саливарни нива са **близки** до тези в серума (UA, pH, sIgA, урея, Ca^{++} и др.) имат съотношение на концентрациите си в слюнка спрямо серум вариращо между **0.5 и 1.5**
3. анализи, чиито стойности в слюнката са значително **по-високи** от тези в серума (като sAA, LDH, K^+ , неорганичен фосфор, нитрити/нитрати и др.)

имат съотношение на концентрациите си в слюнка спрямо серум **по-голямо от 1.5**

На таблица 19 сме категоризирали изследваните от нас слюнчени параметри чрез сравнение на определените от нас РГ в слюнка, съпоставени с общоприетите им референтни граници в серум, което потвърди тези съотношения на концентрациите в слюнка/серум.

Таблица 19. Сравнение между саливарните и серумни нива на изследваните анализи

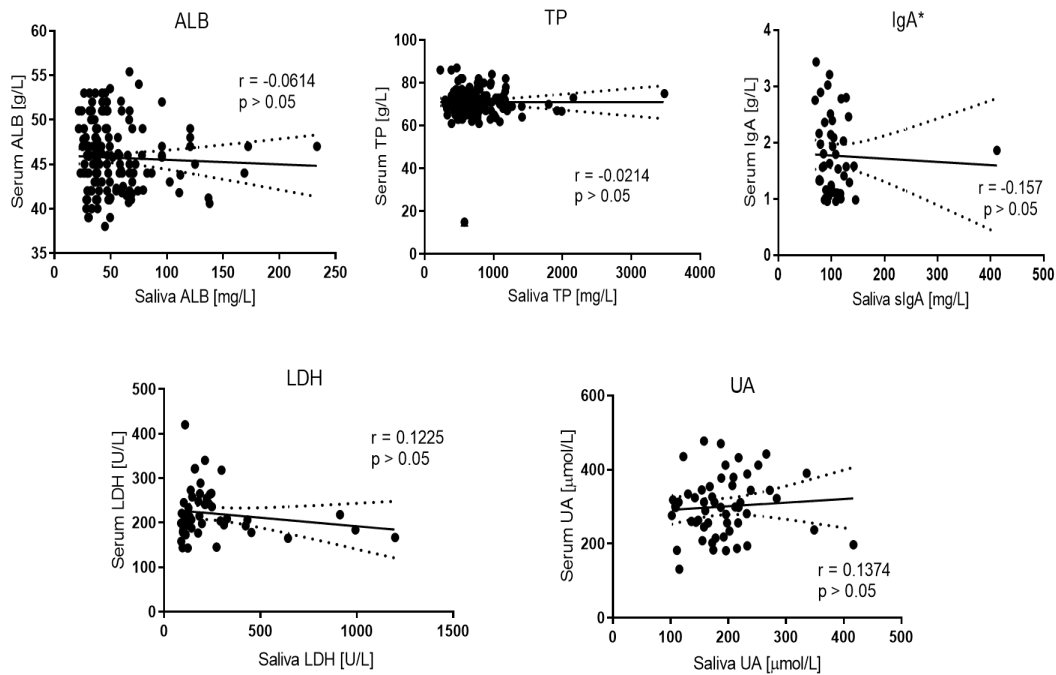
Показател (мерна единица)	Определени от нас РГ в нестимулирана слюнка	Общоприети РГ в серум	Категория, в която попада слюнчения анализ
UA [$\mu\text{mol/L}$]	145÷320	до 420	2
sIgA [mg/L]	67.8÷144.6	700÷4000*	2*
LDH [U/L]	96÷360	134÷225	2
TP [mg/L]	410÷1177	66000÷84000	1
ALB [mg/L]	29.4÷82.4	36000÷53000	1
Nitrite [$\mu\text{mol/L}$]	25÷121	1.3÷13.0 ¹	3
sAA [U/L]	17620÷79950	до 100	3
pH	6.0÷7.5	7.36÷7.44	2
WBC	0.130÷0.351x10 ⁹ /L	3.5÷10.5x10 ⁹ /L	1

* посочени са стойности за общия IgA в серум, а sIgA в серум представлява до 10% от общия IgA;

¹ според Tsikas D. (2012)

Обсъждане

Слюнката има сложен механизъм на образуване и съдържа разнообразни анализи с различен произход. Като биологичен материал, който би могъл да предостави допълнителни данни, полезни за диагностичния процес, възниква необходимост да се проучат и корелационните зависимости между концентрациите на изследваните параметри в слюнка и тези в серум. При здрави индивиди не се доказва значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум (фиг.5). Нашите данни се потвърждават от изследванията на редица автори, които също не откриват корелация между слюнчените и серумни нива за повечето показатели при здрави индивиди (Nunes et al., 2011; Bel'skaya et al., 2020). Вероятно това се дължи на факта, че слюнката не е просто пасивен "ултрафилтрат" на серума и съставът ѝ се определя от разнообразни фактори, водещи до различни съотношения на нейните компоненти в сравнение с тези в серума.



Фигура 5. Корелационни зависимости между слюнчени и серумни нива на изследваните биохимични показатели

**IgA в слюнка отразява sIgA, определен с ELISA метод, а IgA в серум отразява общия IgA, определен имунотурбидиметрично. За ALB, TP и UA (параметри с нормално разпределение на стойностите) е приложен параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент, а за sIgA и LDH (параметри с негаусово разпределението на стойностите) е приложен непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman r коефициент.*

5. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични заболявания на горния ГИТ

Етиопатогенетично хроничните гастрити биват няколко вида: тип А (честота около 2-5%) – автоимунна генеза с атрофия на стомашната лигавица; тип В (честота 80-85%) – засягащ антрума на стомаха и дължащ се на НР инфекция; тип С (честота 5-10%) – причинява се от различни химични агенти (НСПВС, КС и др. медикаменти, алкохол, агресивно действие на жлъчката при рефлукс към стомаха и др.). Редица коморбидни състояния и медикаменти провокират диспептични оплаквания и водят до обостряне на гастрита.

5.1. Характеристика на пациентите с хронични гастрити

Диагностицирането на пациентите с хронични гастрити се основава на Консенсус за диагностика и лечение на инфекция с *Helicobacter pylori* (НР), базиран на хроничния ход на клиничните прояви, ендоскопската находка и неинвазивни изследвания, доказващи наличието на микроорганизма (Malfertheiner et al., 2017). Класификацията се основава на морфологичен принцип и включва хистологични и ендоскопски критерии.

Групата на пациентите е разделена на две подгрупи – първа подгрупа, включваща пациентите с хроничен гастрит и наличие на антитела и антигени, свързани с НР инфекция (НР(+)) гастрити и втора подгрупа, включваща пациентите с хроничен гастрит, несвързан с НР инфекция (НР(-)) гастрити).

Таблица 20. Демографски характеристики на пациентите с хроничен гастрит

Изследвани лица	Мъже	Жени	Общо
НР(+) гастрити (n) възраст (mean±SD)	27 (55.2±11.9)	17 (58.0±12.8)	44 (56.6±12.1)
НР(-) гастрити (n) възраст (mean±SD)	10 (63.6±10.9)	6 (58.0±12.2)	16 (60.8±10.1)
Общо (n) възраст (mean±SD)	37 (59.4±12.1)	23 (58.0±12.3)	60 (58.7±12.1)

Клинично пациентите са имали повтарящи се оплаквания като болка и тежест в епигастриума, възникващи след хранене, гадене, киселини в стомаха, намален апетит, лош вкус и др. със средна продължителност около 2.9 години (времеви диапазон 1÷10 години). При почти половината от изследваните лица от пациентската група (n=28) обострянето на заболяването е провокирано от системна употреба на медикаменти във връзка с придружаващи заболявания. Като се има предвид средната възраст на изследваната група 58.7±12.1 години, често срещани придружаващи заболявания са сърдечна недостатъчност (n=8), която би могла да доведе и до хипоксемичен гастрит, ставни заболявания (n=12), хипертонична болест (n=8). Приложението на редица медикаменти в постоянната или временна терапия на посочените придружаващи заболявания като антиаритмици, антиагреганти, В-блокери, калциеви антагонисти, НСПВС, антибиотици и др. се свързва с провокация на диспептичния и болков синдром. Важен обострящ фактор, водещ до засилване на оплакванията, е системната злоупотреба с алкохол (n=4). Друг вреден фактор, способстващ иритативните промени на лигавицата на ГИТ е тютюнопушенето, като осемнадесет от пациентите с хронични гастрити са активни пушачи.

Диагнозата на хроничния гастрит се основава главно на инвазивен ендоскопски метод. При постъпване в болничното заведение пациентите са подложени на ендоскопско изследване, чиито резултати са обобщени в Табл. 21.

Таблица 21. Ендоскопски характеристики на възпалителните промени и топографско разпространение в гастродуоденалната лигавица

Ендоскопска характеристика	Регионални промени (n)	Дифузни промени (n)	Общо (n)
Еритематозен гастрит	15	10	25
Ерозивен гастрит	13	18	31
Атрофичен гастрит	0	4	4
Общо	28	32	60

5.2. Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при хронични гастрити и установяване на корелационни зависимости между тях

Въпреки че диагнозата на хроничния гастрит се базира най-вече на морфологичните промени в стомашната лигавица, често се използват и различни лабораторни показатели, макар и недостатъчно специфични. Те служат предимно при мониториране на заболяването, защото варират в резултат на промени във възпалителния отговор, клиничните прояви и усложненията от протичането на гастрита.

За целите на проучването са подбрани и изследвани няколко показателя в слюнка и серум, свързани с възпалението, оксидативния стрес и имунологичните механизми на защита (таблици 22 и 23).

Таблица 22. Изследвани слюнчени параметри при пациенти с хроничен гастрит в сравнение с контролната група

Параметри (мерна единица) Референтни граници	HP(+) пациенти (mean±SD)	HP(-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	<i>p</i> value
UA [$\mu\text{mol/L}$] (145÷320)	210.6±56.9	219.8±58.5	222.9±36.8	$p^*=\text{ns}$ $p^{**}=\text{ns}$ $p^{***}=\text{ns}$
TP [mg/L] (410÷1177)	903.8±335.7	788.8±237.6	710.9±338.6	$p^*=\text{ns}$ $p^{**}=0.002$ $p^{***}=0.055$
ALB [mg/L] (29.5÷82.4)	98.2±63.3	62.6±22.8	50.8±19.9	$p^*=0.008$ $p^{**}<0.0001$ $p^{***}=0.05$
sIgA [mg/L] (67.8÷144.6)	139.9±33.2	98.3±18.4	108.3±47.7	$p^*=0.001$ $p^{**}=0.0004$ $p^{***}=\text{ns}$
LDH [U/L] (96÷360)	345.9±193.4	261.0±94.0	187.7±30.7	$p^*=0.010$ $p^{**}<0.0001$ $p^{***}=0.004$
sAA [U/mL] (17.62÷79.95)	112.03±73.80	71.6±62.0	58.38±44.95	$p^*=0.002$ $p^{**}<0.0001$ $p^{***}=\text{ns}$
Нитрити [$\mu\text{mol/L}$] (25÷121)	131.5±32.6	80.2±38.0	85.3±75.5	$p^*=0.012$ $p^{**}=0.0002$ $p^{***}=\text{ns}$

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p^* – сравнение между HP(+) и HP(-) пациенти; p^{**} – сравнение между HP(+) пациенти и контролната група; p^{***} – сравнение между HP(-) пациенти и контролната група).

Таблица 23. Изследвани серумни параметри при пациенти с хроничен гастрит в сравнение с контролната група

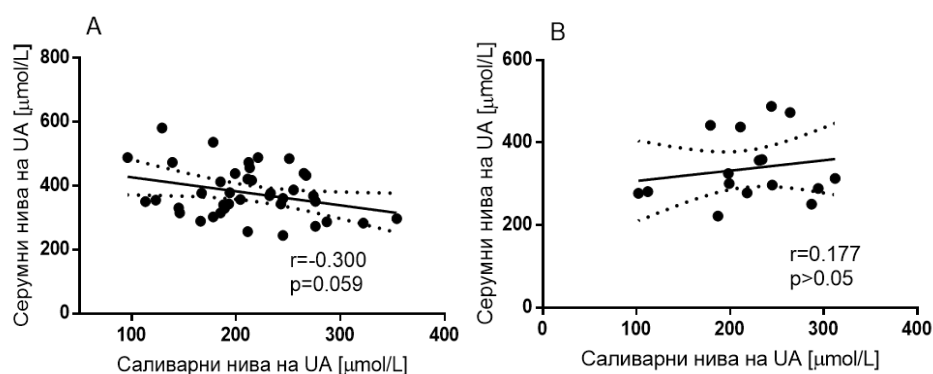
Параметри (мерна единица) Референтни граници	HP(+) пациенти (mean±SD)	HP(-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
UA [$\mu\text{mol/L}$] (154÷420)	382.0±78.7	336.9±72.2	340.8±67.7	p*=0.05 p**=0.018 p***=ns
TP [g/L] (66÷85)	70.4±7.0	72.2±4.4	72.5±5.5	p*=ns p**=0.061 p***=0.71
ALB [g/L] (36÷52)	43.8±6.2	45.3±4.2	46.6±4.3	p*=ns p**=0.008 p***=ns
IgA [g/L] (0.70÷4.0)	2.62±1.3	1.97±0.8	1.85±0.8	p*=0.042 p**=0.0002 p***=ns
LDH [U/L] (120÷240)	202.1±61.5	196.3±46.6	174.9±36.7	p*=ns p**=0.012 p***=0.046
α -amylase [U/L] (30÷100)	77.7±40.4	75.0±37.5	64.7±16.5	p*=ns p**=ns p***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с *One way ANOVA* с корекция на *Bonferroni*. (p* – сравнение между HP(+) и HP(-) пациенти; p** – сравнение между HP(+) пациенти и контролната група; p*** – сравнение между HP(-) пациенти и контролната група)

Инфекцията с HP причинява хроничен гастрит и предизвиква постоянен възпалителен отговор. Явно това води до съществени промени в изследваните параметри в слюнката. В настоящето проучване само за слюнкените нива на **пикочната киселина (UA)** не се установяват статистически значими различия между трите изследвани групи, въпреки че се очертава тенденция за намалението им при пациентите с HP(+) гастрит. В литературните източници, отнасящи се до HP(+) хронични гастрити, не сме открили информация за взаимовръзка между саливарните нива на UA и етиопатогенетични и клинични характеристики на хроничните гастрити. Относно серумните стойности на UA, при HP(+) гастрити се установи статистически значими разлики (382.0±78.7 $\mu\text{mol/L}$) в сравнение както с контролната (340.8±67.7 $\mu\text{mol/L}$), така също и с HP(-) групи (336.9±72.2 $\mu\text{mol/L}$). Липсва статистическа значимост между нивата на UA в HP(-) и контролната група, което също е в потвърждение на литературните данни, че HP инфекция предизвиква не само локални възпалителни реакции, но и системни нарушения. Инфекцията с HP води до увеличение на провъзпалителните фактори IL-1, IL-8 и TNF- α , които от своя страна предизвикват метаболитни промени и системни имунни отговори (Lu et al., 2018). Направен е опит да се докаже причинно-следствената връзка между повишени нива на UA (могат да имат

проинфламаторно действие) и редица метаболитни нарушения като дислипидемия и нарушен глюкозен толеранс при миши модели (Lu et al., 2015).

По литературни данни съществува статистически значима умерена корелационна зависимост между нивата на UA в серум и тези в слюнка при здрави и млади индивиди (Riis et al., 2018; Bilancio et al., 2019). В настоящото проучване, при изследване на серумни и слюнчени нива на UA се откри както в контролната група, така и в групата с HP(-) гастрити статистически незначима и слаба позитивна корелационна взаимовръзка (съответно Pearson $r=0.175$, $p>0.05$ и Pearson $r=0.177$, $p>0.05$). За разлика от тях в групата с HP(+) гастрити се наблюдава умерена и негативна корелация (Pearson $r=-0.300$, $p=0.055$) с гранична стойност по отношение на статистическата значимост. Графическата зависимост за двете пациентски групи е представена на фигура 6. Проявявайки екстра-гастрални ефекти, HP инфекция вероятно предизвиква и системно възпаление, водещо до покачване на UA в серума. За разлика от повечето генерализирани патологични състояния (метаболитен синдром, дислипидемия и др.), при които се наблюдават повишени нива на слюнчената UA в резултат на нарастване на серумните ѝ стойности, при заболявания, които водят до локални възпалителни и дегенеративни промени се откриват обратни взаимоотношения. Като съединение с най-голям дял от общия антиоксидантен капацитет на слюнката, UA е един от чувствителните биомаркери, показващ промени в хода на различни локални заболявания в резултат на възникнал оксидативен стрес. Това може да обясни наблюдаваната негативната корелационна връзка между серумните и слюнчените нива на UA.

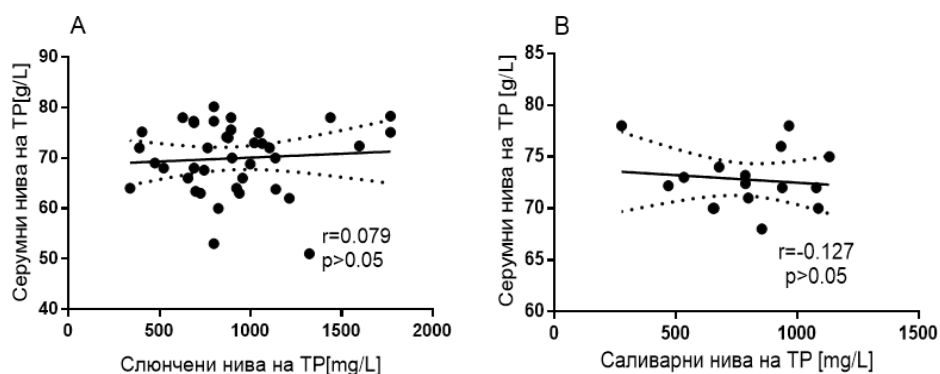


Фигура 6. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на UA в пациентските групи

A. HP(+) гастрити (n=44) и B. HP(-) гастрити (n=16)

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Общият белтък е основен компонент на слюнката, отговорен за повечето ѝ функции. Основните фактори, влияещи върху концентрацията на белтъка в слюнката са скоростта на слюнчения поток, секрецията на протеини от жлезите и кревикуларната течност (Shaila et al., 2013). Диспепсията, болката и ефекта на лекарствата, използвани при лечението на хроничен гастрит (Butylscopolamine, антибиотици, Drotaverine Hydrochloride, Omeprazole) могат да повлияят на слюнчената секреция по пътя на стимулиране на симпатиковата нервна система и да предизвикат ксеростомия. Посочените причини вероятно обуславят и нашите резултати, сочещи по-високи стойности на ТР в слюнката на пациентите с НР(+) гастрити в сравнение с контролната група ($p=0.002$). Увеличението на слюнчения протеин вероятно отразява локална жлезиста секреция на протеини, участващи в специфичната и неспецифична имунна защита на гостоприемника в отговор на патогенния микроорганизъм (Shaila et al., 2013). Доколкото ни е известно, в научната литература липсват данни относно промени в количеството на общия белтък в слюнка във връзка с НР(+) инфекция и вероятно нашето изследване е едно от първите в тази посока. Наблюдаваните различия в саливарните нива на ТР в изследваните групи не се откриват за ТР в серум. При изследване на връзка между серумни и слюнчени нива на ТР не се установява корелационна зависимост както в общата пациентска (Pearson $r=0.093$; $p>0.05$), така и в контролната група (Pearson $r=-0.098$; $p>0.05$). На фигура 7 са представени корелационните зависимости между серумни и слюнчени нива на ТР в групата на НР(+) гастрити (Pearson $r=0.079$; $p>0.05$) и тази на НР(-) гастрити (Pearson $r=-0.127$; $p>0.05$). ТР в слюнка не е резултат от ултрафилтрацията на серума, а на увеличената му glandularна секреция при наличен локален възпалителен процес. Така леките различия, които се наблюдават в двете пациентски групи се дължат най-вероятно на различията в етиологията им и наличието на локални лигавични и секреторни промени при НР(+) гастрити.

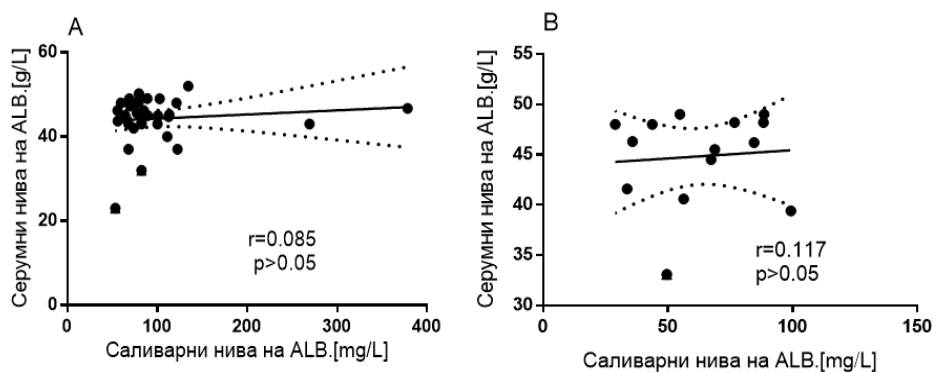


Фигура 7. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ТР в пациентските групи

А. НР(+) гастрити (n=44) и В. НР(-) гастрити (n=16)

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Албуминът е най-голямата фракция от общия белтък в серум и факторите, които регулират синтезата му са хранене, хормонален баланс и осмотично налягане (Rantonen and Meurman, 2000). За разлика от серума, в състояние на добро орално здраве албуминът в цяла слюнка представлява незначителна част от общия белтък, но въпреки това може да участва в антиоксидантната защита. Повишените стойности на ALB в слюнка при мукозит дават цялостна оценка за степента на възпаление на лигавицата, поради увеличената ѝ пропускливост и улеснена филтрация на албумин (Vaziri et al., 2009; Shahbaz et al., 2015). В нашето проучване се наблюдава статистически значимо увеличение на албумина в НР(+) пациентската група в сравнение както с НР(-) пациенти с хронични гастрити, така и с контролната група. Освен това средните стойности на слюнчения албумин в НР(+) група е извън определените от нас референтни граници за този показател. В някои литературни източници се установява, че с напредване на възрастта стойностите на саливарния албумин постепенно нарастват, заради промени в съзъбието и съдовете на слюнчените жлези и механичното въздействие на мостове, частични протези и други дентални импланти (Shaila et al., 2013). В нашето проучване тези възрастови промени не се оказаха значими за здравата ни популация. Като се има предвид, че възрастови отличия между пациентите с хроничен гастрит и контролната група липсват ($p > 0.05$), а в самата пациентска група тези, които са с НР(+) инфекция са относително по-млади от тези без НР инфекция ($p = 0.25$), може да се заключи, че различията в стойностите на слюнчения албумин са по-скоро патогенетично, а не възрастово обусловени. Очевидно локалното възпаление на ГИТ оказва ефект върху устната кухина чрез вариации във филтрацията на албумина през капилярите на слюнчените жлези. Стойностите на серумния албумин са в референтни граници и за трите изследвани групи, като статистически значими различия се наблюдават единствено между НР(+) пациентска група и контролната група, дължащо се на факта, че албумин спада към групата на отрицателните острофазови белтъци и отразява системното влияние на НР инфекция. Както беше вече разгледано в т. 4-та от раздел IV (Резултати и обсъждане) на настоящия труд, липсва корелационна зависимост между серумните и слюнчени нива на албумин в референтната ни група ($n = 186$, средна възраст 41.6 ± 8.9 години, Pearson $r = 0.061$, $p > 0.05$), така и в подбраната спрямо пациентите с хронични гастрити контролна група ($n = 80$, средна възраст 56.9 ± 8.7 години, Pearson $r = 0.169$; $p > 0.05$). На фигура 8 са посочени корелационните зависимости между серум и слюнка за албумин в двете пациентските групи, при които също липсва корелационна зависимост.



Фигура 8. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ALB в пациентските групи

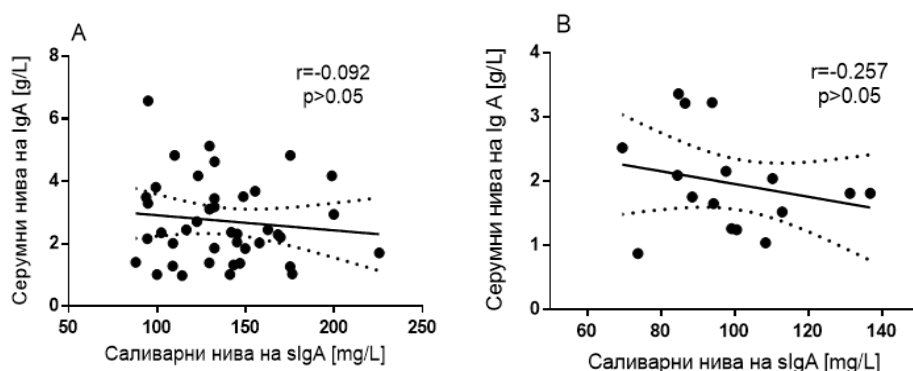
A. HP(+) пациенти: n=44; B. HP(-) пациенти: n=16

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Секреторният IgA (sIgA), като компонент на адаптивната имунна система, е преобладаващата форма на имуноглобулините и участва в специфични имунни реакции за защита на лигавичните повърхности в ГИТ (Akhiani et al., 2005). HP е силно адаптиран към неблагоприятните условия в стомаха (изключително ниско рН на стомашния сок), което спомага интегрирането му в лигавичния слой и инфилтрирането на стомашната мукоза с неутрофили, лимфоцити, плазматични клетки, макрофаги и еозинофили (Akhiani et al., 2005). Въпреки стимулираното локално възпаление с производството на антитела тип IgA, имунният отговор на гостоприемника се оказва недостатъчно ефективен, поради което инфекцията с HP хронифицира (Wilson et al., 2007; Srivastava et al., 2013). Резултатите в настоящето проучване показват значително повишени стойности на sIgA в слюнка при пациентите с HP(+) в сравнение с HP(-) и контролната група (табл. 24). Това повишение вероятно се дължи на ролята на sIgA за намаляване на бактериалната плътност и активната хуморална защита на стомашната лигавица. По литературни данни се установява, че sIgA се увеличава с възрастта до 60-та година и след това секрецията му намалява дори и при здрави индивиди (Jafarzadeh et al., 2010). Интересно наблюдение е, че най-ниски стойности на sIgA се наблюдават в HP(-) група (98.3 ± 18.0 mg/L). Трябва да се отбележи, че това е групата с най-широк възрастов диапазон (48-78 години), като 69% от индивидите в нея са над 60 год. Така възрастово обусловеното намаление на sIgA предполага по-лесна ранимост на лигавицата от различни токсични и исхемични нокси, водещи до хронични HP(-) гастрити. В литературата няма много данни относно количеството на sIgA при HP(+) гастрити, а се изследват най-вече нивата на слюнчените специфични антитела от IgA клас, насочени към специфични антигени на HP.

Резултатите, касаещи серумните нива на IgA, са аналогични на тези в слюнка, като най-високи стойности се наблюдават в група с НР(+) гастрити, различаващи се значимо от стойностите му както в групата с НР(-) гастрити, така и в контролната група (табл. 25). Освен посочените по-горе статистически значими различия, е интересно да се подчертае, че средната стойност на sIgA в слюнка при НР(+) гастрити попада в горно-граничната област на определените от нас референтни граници и сравнително голяма част (38.6%) от индивидуалните стойности на sIgA в тази група са извън референтния интервал. За разлика от тях стойностите на IgA в серум и в трите изследвани групи попадат изцяло в референтния диапазон, определен от производителя на теста и по тази причина имат ниска диагностична значимост.

При направения корелационен анализ между нивата на серумния IgA и тези на слюнчения sIgA не се открива значима корелационна връзка, както в общата група пациенти с гастрити (Pearson $r=0.128$; $p>0.05$), така и в контролната група (Pearson $r=0.03$; $p>0.05$). На фигура 9 са представени графично корелационните зависимости в пациентските подгрупи с НР(+) и НР(-) гастрити. Отново се установява, че липсва корелационна зависимост между тези показатели.



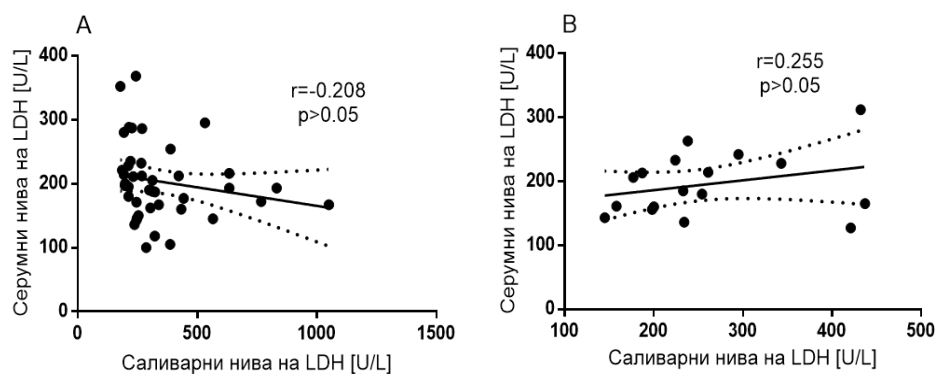
Фигура 9. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на sIgA в пациентските групи

A. НР(+) пациенти: n=44; B. НР(-) пациенти: n=16. Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Основни фактори за вирулентност на НР бактерии са вакуолизиращият цитотоксин А (VacA) и цитотоксин-асоциираният ген А (CagA). Установено е, че VacA причинява редица промени в прицелните клетки на гостоприемника, като клетъчна вакуолизация, деполяризация на плазмената мембрана, отделяне на епителните клетки от базалната им мембрана, автофагия, инхибиране на активността и пролиферацията на Т-клетките. Причинената от цитотоксините апоптоза и смърт на стомашни епителни клетки води до освобождаване на вътреклетъчната LDH и обуславя по-високите й активности в извънклетъчната течност. Ето защо активността на ензима LDH в слюнка се явява полезен

биохимичен маркер за некроза, не само в устна кухина, но и в стомашно-чревния тракт. Статистически значимо по-високите стойности на LDH както при HP(+), така и при HP(-) пациенти спрямо контролните индивиди (съответно $p < 0.0001$ и $p = 0.004$) потвърждават този факт. Нашите резултати се подкрепят и от изследването на Motamedi и сътр. (2013), които установяват значимо по-високи стойности на ензима в слюнката на пациенти с хроничен гастрит и язва, без да е уточнена тяхната етиология. Наблюдаваните статистически значимо по-ниски стойности на слюнчената LDH в групата с HP(-) гастрити в сравнение с тези от групата на HP(+) гастрити (съответно 261.0 ± 94.0 U/L и 345.9 ± 193.4 U/L, $p = 0.010$), вероятно се дължи на по-тежко степенните лигавични увреди предизвикани от HP инфекция. Аналогични промени, подобни на тези в слюнката, се установяват и в серумните стойности на LDH: и двете пациентски групи с HP(+) и HP(-) гастрити имат статистически значимо по-високи нива на ензима в сравнение с тези на контролната група (съответно $p = 0.012$ и $p = 0.048$), макар че остават в референтните граници на лабораторния метод, определен от производителя на теста, но помежду си двете пациентски групи не се различават ($p = 0.842$). По тази причина те имат ниска диагностична значимост. За разлика от тях, средните стойност на LDH в слюнка при пациентите с HP(+) хронични гастрити попадат в горно-граничната област на определените от нас референтни граници, а една пета от индивидуалните стойности на ензима в тази група са извън референтния интервал. Значимостта на различията в двете пациентски групи е повод да се предложи слюнчената LDH също и като показател, който може да отдиференцира хроничните гастрити според етиологичния фактор.

На фигура 10 е представен графичният израз на корелационните зависимости между серумните и слюнчени нива на ензима LDH в двете пациентски групи. И при тях, както и в контролната (Spearman $r = 0.084$, $p > 0.05$) и референтната (Spearman $r = 0.123$, $p > 0.05$) групи липсва значима корелационна зависимост.

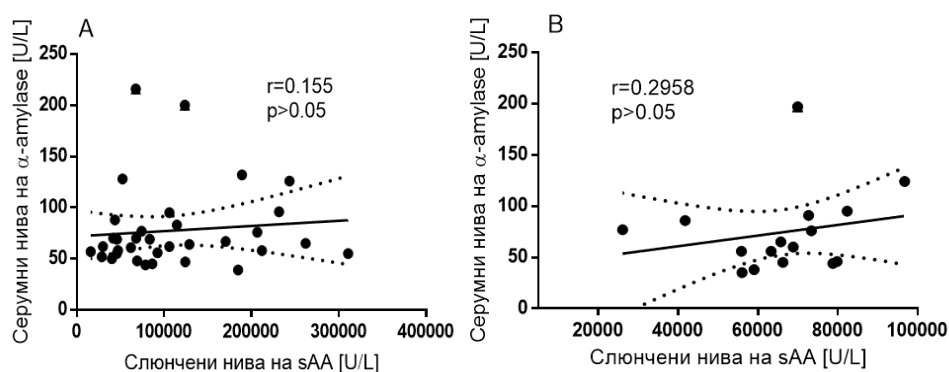


Фигура 10. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на LDH в пациентските групи

A. HP(+) пациенти: $n = 44$; B. HP(-) пациенти: $n = 16$.

Приложен е непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman r коефициент

Слюнчената амилаза (sAA) е един от най-широко вариращите показатели в саливарната течност, влияеща се от множество фактори. Секрецията на sAA в слюнчените жлези е подчинена много повече на психо-невроендокринното въздействие на стреса, отколкото на вариации в дебита и на възрастта (Arhakis et al. 2013). В настоящето проучване се наблюдава висока активност на ензима, надскачаща определените от нас референтни граници за групата с НР(+) хронични гастрити и различаваща се статистически значимо от активността на ензима както в групата с НР(-) хронични гастрити, така и в контролната група (табл. 24). Нашите данни се потвърждават от изследванията на Motamedi и сътр. (2013). Вероятно диспептичните прояви и болковия синдром при тези заболявания водят до стресово стимулирана слюнчена секреция на ензима. За разлика от sAA стойностите на серумната алфа-амилаза при здрави лица варират в значително по-тесни граници и са приблизително 1000 пъти по-ниски от тези в слюнката. В настоящето проучване активността на алфа-амилазата в серум е в референтни граници, като не се установяват статистически значими разлики между трите изследвани групи. Въпреки, че НР инфекция води до значимо повишени слюнчени нива на ензима, това не се отразява на серумните му нива, което е едно допълнително доказателство за стресово индуцираната му секреция от слюнчените жлези, а не на тяхната деструкция. Това от своя страна може да обясни липсата на корелационна взаимовръзка между серумните и слюнчени нива на ензима при пациентите с хронични гастрити (фиг. 11А и В). В контролната група също липсва корелационна взаимовръзка (Spearman $r=-0.086$, $p>0.05$).



Фигура 11. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ензима алфа-амилаза в пациентските групи

*A. НР(+) пациенти: n=44; B. НР(-) пациенти: n=16. (sAA – слюнчена алфа-амилаза)
Приложен е непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman r коефициент*

Слюнчените жлези и оралната микрофлора имат съществено значение за поддържане хомеостазата на азотния оксид (NO). При здрави лица нитритът, присъстващ в погълнатата слюнка, се превръща в азотен оксид под въздействие на солната киселина в стомаха. Образуването на слюнчен нитрит с помощта на

симбиотичните факултативни анаеробни бактерии в орофаринкса, засилват антимикробната активност на стомашния сок (Dykhuisen et al., 1998). Това е неензимният път за синтез на азотен оксид, за сметка на приетите с храната нитрати, за разлика от класическия (ендогенен) път, в който участие вземат NO-синтетази. Резултатите от настоящето проучване показват, че стойностите на нитритите в слюнка са най-високи в групата на НР(+) гастрити и са статистически значимо различни спрямо нитритите в останалите две групи. Освен това средната им стойност попада извън определените от нас референтни граници за този показател. Повишената концентрация на нитрити в слюнката вероятно е защитен отговор на гостоприемника срещу патогенния организъм. Генерираните при тази неензимна реакция реактивни азотни съединения (RNS – напр. пероксинитрит, NO-радикал и др.) притежават цитотоксични свойства и антибактериалните им ефекти са свързани с механизма на инхибиране на съществения за метаболизма на НР бактерии ензим уреаза. Концентрацията на нитрити в човешката слюнка варира в широки граници от 50 до 1000 $\mu\text{mol/L}$, зависи най-вече от приема на нитрати с храната, докато тези в стомашния сок са значително по-ниски, поради възможността да се редуцират до азотни оксиди (NO, NO₂). Установено е също, че ентеро-саливарната циркулация на нитратите има отношение към поддържане дебелината на стомашната мукоза и повишаване устойчивостта ѝ към патогени (Björne et al., 2004). От друга страна възпалителният процес причинен от НР с инфилтрация в стомашната мукоза, стимулира експресията на индуцируемата NO-синтаза (iNOS). iNOS е свързана с производството на NO, който е фактор на кислород-зависимата система за антивирусна и антибактериална защита на макроорганизма, но повишената ѝ експресия води до натрупване на свободни радикали в тъканите, обостря възпалението и нарушава процесите на регенерация. Нивата на нитрити при НР(-) пациенти (групата с най-висока средна възраст) са ниски и неотличаващи се от тези в контролната група. Различната етиология, несвързана с НР инфекция, на този тип хронични гастрити вероятно не води до индуциране синтезата на iNOS и съответно до липсващо нарастване на нитритите. Повечето намерени данни в литературата са свързани със стомашните нитрити, асоциирани с НР инфекция, докато информация за стойностите им в слюнка липсва.

Апробираният и валидиран от нас метод за определяне на нитрити в слюнка е с недостатъчна аналитична чувствителност за определяне на стойности под 9.3 $\mu\text{mol/L}$. По литературни данни базисните нива на нитрити в плазма са 2-4 $\mu\text{mol/L}$ (Miller et al., 2012). По тази причина в настоящето проучване нива на нитрити в серум/плазма не са определяни и не е възможно да се направи корелационен

анализ между серумни и слюнчени нива на този показател в изследваните от нас групи.

5.3. Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с хронични гастрити

Многобройните структурни и функционални взаимодействия на различните клетъчни елементи способстват интегритета на оралната мукоза и противопоставянето ѝ на различни химически, микробни и физически екзогенни патогени. Постоянното обновяване на епителните клетки е важен фактор, необходим за поддържането на орално-стомашната лигавична бариера. Устната кухина се явява входна врата за проникване на НР бактерии в храносмилателната система, а често и огнище за реинфекция. При възпалителната реакция, предизвикана от НР, макрофагите и PMNs клетки инфилтрират мукозата и освобождават вазоактивни агенти и провъзпалителни медиатори, които увреждат епителните клетки и влошават микроциркулацията на лигавицата. В литературата не са намерени достатъчно данни, свързани с промени в клетъчния състав на слюнката както в норма, така и при различни системни заболявания, включително и хроничните гастрити.

Резултатите от определяне на броя на клетките в нестимулирана слюнка при всички изследвани групи са представени на таблица 24.

Таблица 24. Брой на клетъчните елементи в нестимулирана слюнка в трите изследвани групи

Клетки [cells/ μ L] (референтни граници)	НР(+) пациенти (mean \pm SD)	НР(-) пациенти (mean \pm SD)	Контролна група (mean \pm SD)	<i>p</i> value
RBC (14.0÷156.0)	100 \pm 27.5	82 \pm 15.9	78.1 \pm 40.7	p*=ns p**=0.006 p***=ns
WBC (58÷451.0)	367.7 \pm 148.4	273.9 \pm 105.9	280.2 \pm 171.6	p*=0.056 p**=0.024 p***=ns
EC (104 ÷698)	744.2 \pm 638.4	579.9 \pm 253.7	537.0 \pm 254.8	p*=0.064 p**=0.011 p***=ns
Bacteria (1810÷5115)	3237 \pm 1230	3406 \pm 1315	2958 \pm 1849	p*=ns p**=ns p***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p – сравнение между НР(+) и НР(-) пациенти; p** – сравнение между НР(+) пациенти и контролната група; p*** – сравнение между НР(-) пациенти и контролната група)*

Доказано е статистически значимо нарастване на броя на еритроцити, левкоцити и епителни клетки при пациентите с НР(+) гастрити в сравнение с контролната група, но относно броя на бактериите такова различие не се установява. Прави впечатление, че между двете пациентски групи, относно броя на клетъчните елементи, не се наблюдава статистическо различие, макар че се наблюдава тенденция за значимост за ЕС и левкоцити.

Обсъждане на резултатите

Левкоцитите и епителните клетки, като основни компоненти на лигавичната епителна бариера, са най-засегнати при физиологични и патологични състояния. Наблюдаваните различия в броя на клетъчните елементи вероятно се дължат на хроничния възпалителен процес чрез повлияване конфигурацията на клетъчно-клетъчните връзки, дехидратацията, неправилното хранене и дисбактериоза. Липсата на различия в броя на клетъчните елементи между групата с НР(-) гастрити и контролната група навежда на мисълта, че етиологичният фактор, а именно НР инфекция, вероятно играе съществена роля по отношение на тези различия.

Wagner и сътр. (1997) предоставят доказателства в подкрепа на хипотезата, че НР бактерии са в състояние директно да индуцират апоптоза на мукозните епителни клетки. Това би довело до повишеното им излющване и попадане в слюнката. Тази хипотеза се потвърждава и в нашето проучване с установените статистически значимо по-високи стойности на епителните клетки в двете групи с хроничен гастрит (744.2 ± 638.4 клетки/ μL за НР(+) гастрити и 579.9 ± 253.7 клетки/ μL за НР(-) гастрити). Интересно е да се подчертае, че единствено и само този вид клетки попада извън референтния диапазон на определените от нас референтни граници за групата на НР(+) гастрити.

Останалите изследвани клетъчни елементи (RBC и бактерии) в слюнката попадат в определените от нас референтни граници, не е особено удачно да се коментират техните промени и да се обвързват с етиопатогенетични и други фактори. Относно броят на бактериите, може да се отбележи, че при хроничното възпаление се наблюдава не толкова увеличение в броя, колкото променено съотношение на различните видове популации микроорганизми. Доказано е, че НР инфекция причинява дисбиоза на оралната микробиота, която оказва съществено значение за нарушението в имунно-лигавичните механизми на защита (Bruno et al., 2018). Затова изследването на променения баланс на популациите от микробни общности в оралната течност с помощта на микробиологични методи и тестове е много по-информативно отколкото определянето на общия брой бактериалните клетки.

5.4. Резултати и обсъждане от изследването на серумни показатели за оксидативен стрес при пациенти с хронични гастрити

Оксидативният стрес играе съществена роля в патогенезата на хроничното възпаление и дегенеративните промени в стомашната лигавица, причинени от НР инфекция. Стомашно-чревният тракт е предразположен към атака на ROS, тъй като директно контактува с външната среда. Самият храносмилателен процес, лигавичната имунна система и коменсалната микрофлора са потенциални източници на ROS. Гастритът се характеризира с хроничен неспецифичен възпалителен процес на стомашната лигавица с дифузен и локален характер, който постепенно води до атрофия.

С цел оценяването на баланса между нивото на серумните оксиданти и плазмения антиоксидантен капацитет при гастритите са изследвани двата теста dROMs (Реактивни кислородни метаболити), като показател за генериране на ROS и BAP (Биологичен антиоксидантен потенциал), като показател за общ антиоксидантен капацитет на серума. Резултатите за трите изследвани групи и анализа между тях са посочени на таблица 25.

Таблица 25. Серумни нива на ROS, измерени чрез dROMs тест и AOC, измерен чрез BAP тест в изследваните групи

Параметри (мерна единица) Референтни граници	НР (+) пациенти (mean±SD)	НР (-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
dROMs [Ucarr] (252.4÷463.5) ¹	402.5±95.4	350.3±71.2	337.7±35.24	p*=0.024 p**<0.0001 p***=ns
BAP [µmol/L] (2210÷3400) ²	2258±295.5	2440±212.2	2624±279.9	p*=0.05 p**<0.0001 p***=0.003

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p* – сравнение между НР(+) и НР(-) пациенти; p** – сравнение между НР(+) пациенти и контролната група; p*** – сравнение между НР(-) пациенти и контролната група)

Референтните граници за ROS (dROMS тест) са 250÷300 UCARR, а **оптималните нива за AOC (BAP тест) са >2200 µmol/L, според производителя на теста.
^{1,2} определени от нас референтни граници

Установяват се по-високи нива на ROS при пациентите с НР(+) гастрит в сравнение с НР(-), както и спрямо контролните лица. Трябва да се отбележи, че 25% от пациентите в тази група имат стойности извън определения от нас референтен интервал, докато стойностите на показателя при пациентите с НР(-) са изцяло в този интервал. Независимо от наличието на клинични гастритни оплаквания, прави впечатление, че нивата на ROS в индивидите от НР(-) групата

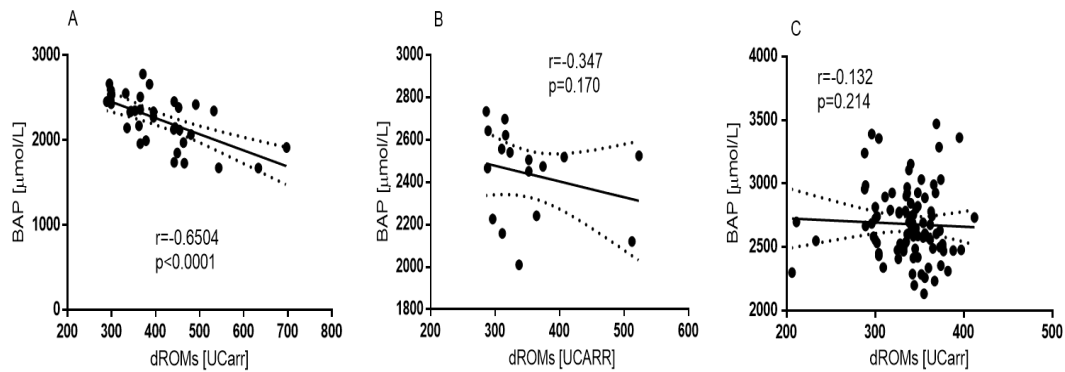
не се различават статистически от тези в контролната група. НР бактерии очевидно предизвикват в по-голяма степен генериране на ROS в сравнение с другите етиопатогенетични фактори, отговорни за НР(-) гастрити. Така НР инфекция е основният фактор, предопределящ статистически значимите различия между изследваните групи.

В потвърждение на резултатите от настоящето проучване са и множество данни от литературата. Инфекцията с НР е свързана с генерирането на свободни радикали, което води до оксидативен стрес в стомашната лигавица (Fukuhara et al., 2008; Li et al., 2001; Baik et al., 1996). Хистологичните изследвания при пациенти с хроничен гастрит установяват, че степента на инфекцията с НР и тежестта на увреждане на лигавицата са пряко свързани с повишената неутрофилна инфилтрация на лигавицата (Danese et al., 2001). Изразените лигавични промени са зависими и от цитотоксините CagA и VacA, които определят по-голямата вирулентност на НР бактерии и тежест на заболяването, като CagA щамове показват засилен оксидативен взрив в PMN (Pich and Merrell, 2013; Zhang et al., 1996).

Успоредно с повишението на ROS, намалява и антиоксидантният капацитет, измерен чрез ВАР теста. Това е най-силно изразено при НР(+) пациенти (табл. 27). Интересно наблюдение е, че има статистическо значимо различие и между контролната група и пациентите с НР(-) гастрити. Вероятно придружаващите заболявания, характерни за НР(-) група, способстват за намалението на антиоксидантният капацитет.

Въпреки, че средните стойности на АОС при НР(+) остават в границите на референтния интервал, при 27% от пациентите се наблюдават стойности под този интервал. Вероятно богатият набор от клетъчни и извън клетъчни антиоксиданти успява да поддържа баланса ROS/АОС и да предотврати възникването на ОС.

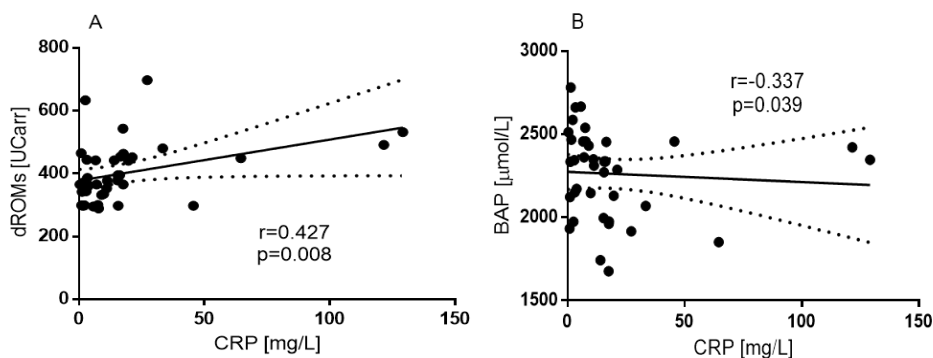
И според Bhattacharyya и сътр. (2014) възпалителната реакция при НР инфекция с генериране на ROS води до бързо изчерпване на АОС. Тази взаимнообвързаност между двата показателя се доказва и в настоящето проучване с установената отрицателна корелация при трите изследвани групи, онагледена на фигура 14 (А,В,С). Логично е тази корелация да е висока и статистически значима за групата с НР(+) гастрити, като силата на корелацията намалява и е статистически незначима за останалите две групи.



Фигура 14. Корелация между нивата на генерираните ROS и AOC, измерени съответно чрез dROMs и BAP тестове при А. HP(+) пациенти: n=44; В. HP(-) пациенти: n=16 и С. контролна група: n=80

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент

Доказаните както повишено генериране на ROS, така и намален AOC при HP(+) гастрити корелират в умерена степен, съответно положително и отрицателно, със серумните нива на CRP като основен възпалителен биомаркер (фиг. 15 А,В).



Фигура 15. Корелация между серумните нива на CRP и ROS (А) и серумните нива на CRP и AOC (В) при HP(+) гастрити

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент

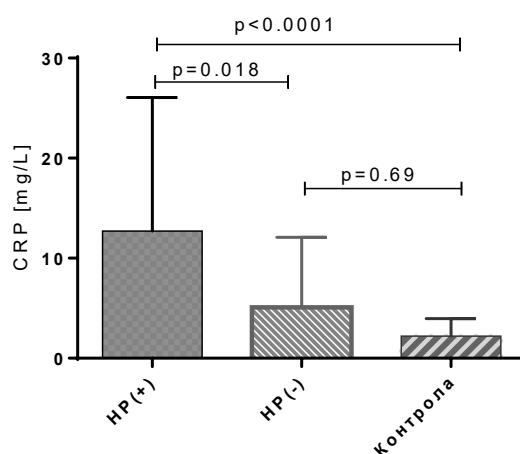
5.5. Корелационни зависимости между изследваните параметри в слюнка и серум с рутинни лабораторни изследвания и ендоскопските промени в стомаха

Резултати и обсъждане

Като острофазов белтък, CRP е утвърден лабораторен показател за оценка на остро възпаление. Въпреки че HP бактерии предизвикват хронична възпалителна реакция при почти всички заразени индивиди, при много от тях не се развиват ясно изразени клинични признаци на инфекция (Pich and Merrell, 2013). Затова изследването на CRP успешно може да служи като маркер за оценка на хронично тлеещото възпаление в стомашната мукоза и рутинно се използва в

клиничната лаборатория. Освен това е установено, че по-тежките нарушения и възпаления на стомашно-дуоденалната лигавица като пептични язви и ерозивен пангастрит се асоциират с по-високи нива на CRP (Altun et al., 2019).

В двете изследвани пациентски групи има установено хронично възпаление и е логично в тези групи стойностите на CRP да са значимо по-високи от тези в контролната група. По-интересен е фактът, че стойностите на CRP в групата на HP(+) гастрити са многократно и значимо по-високи от тези при пациентите с HP(-) гастрити (фиг. 16). Би могло да се лансира хипотезата, че не само хроничният възпалителен процес, но и етиологичният фактор, който го обуславя, играе определяща роля при индукция синтезата на CRP. Етиологичният фактор в групата на HP(-) гастрити е неинфекциозен и възможността за увеличена синтеза на CRP в условията на този тип хронично възпаление е многократно по-ниска.



Фигура 16. Сравнение на серумните нива на CRP в трите изследвани групи

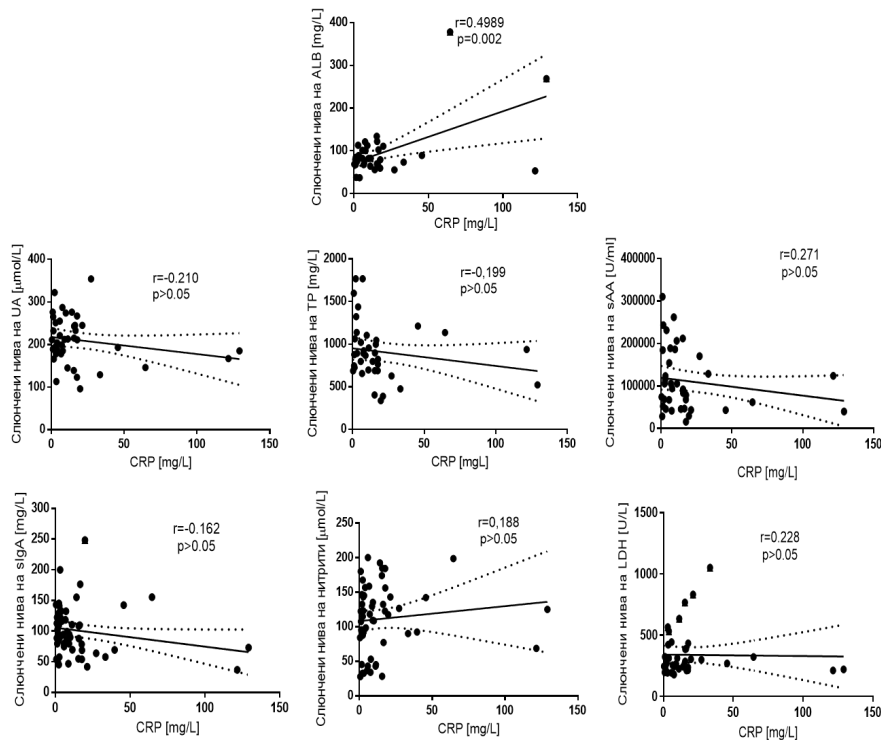
Приложен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni

**CRP референтни граници до 5 mg/L*

В литературата се откриват данни, доказващи слабо до умерено изразена корелационна връзка между нивата на CRP в плазмата с тези в слюнката (Out et al., 2012). Основен проблем при изследването на CRP в слюнка са изключително ниските му стойности от порядъка на $117.69 \div 24156.00$ pg/ml, което изисква специално разработени методи/платформи и редица фактори, водещи до широки вариации и недобра възпроизводимост на резултатите. По тази причина CRP в слюнка не е изследван в настоящето проучване, но са изследвани корелационните зависимости между серумни нива на CRP и различни параметри в слюнка в групата с HP(+) хронични гастрити, представени на фигура 17.

Установява се умерена и статистически значима позитивна корелация единствено между слюнчените нива на албумин и тези на серумния CRP, което е

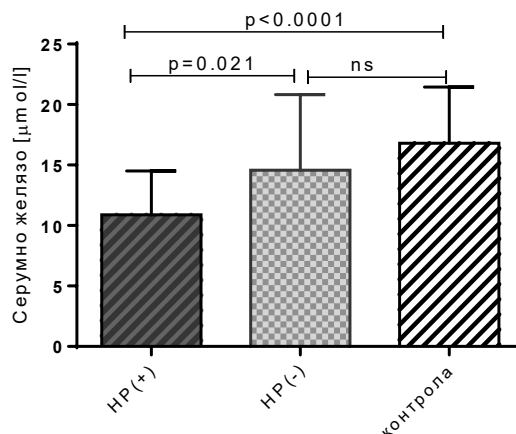
породно доказателство за значимостта на слюнчения албумин при изследване на НР(+) пациенти.



Фигура. 17. Корелационни зависимости между серумни нива на CRP и биохимични параметри, изследвани в слюнката

Приложен е непараметричен корелационен анализ за LDH, sAA и нитрити и изчислен Spearman r коефициент и параметричен анализ за ALB, TP, UA и sIgA и изчислен Pearson r коефициент

Хроничният гастрит и пептичната язвена болест са известни етиологични причини, водещи до желязодефицитна анемия. Желязото е основен жизненоважен микроелемент за почти всички организми, включително и за НР бактерии. Нивата на серумното желязо в групата на пациентите с НР(+) гастрити са статистически значимо по-ниски в сравнение с тези както в групата на НР(-) пациенти, така и в контролната група. Твърде вероятна причина за наблюдаваните статистически значими различия между серумните нива на желязо в двете пациентски групи е етиологичният причинител за хроничния гастрит. Въпреки че нивата на серумното желязо при НР(+) са все още в референтния диапазон, то 1/2 от пациентите имат стойности под долнограничната му област. Данните са представени на фигура 18.

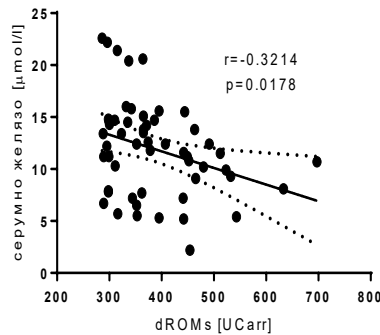


Фигура 18. Сравнение на нивата на серумното желязо в изследваните групи

Приложен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni

При HP инфекция съществува конкуренция между микроорганизма и гостоприемника за желязните катиони. Според Dovhanj и сътр. (2009) микроелементът желязо има двойка роля – от една страна играе роля на кофактор за няколко ензима в HP бактерии, важни за адаптирането му към киселата среда в стомаха, а от друга страна катализира образуването на токсични хидроксилни ROS. Проучвания показват, че HP инфекция води до повишени концентрации на IL-1 или TNF-alpha в стомашния сок, което предизвиква потискане секрецията на стомашна киселина, необходима за усвояването на желязото (Nikolaos et al., 2016). Други проучвания установяват връзка между намаляването на аскорбиновата киселина и хипоацидитета в стомаха при инфекцията с HP (Cardenas et al., 2006; Annibale et al., 2003). HP бактерии и гостоприемникът се „състезават“ за усвояването на желязото от стомашен лумен. Има доказателства, че чрез този механизъм на конкуренция и наличието на регулатор, отговорен за поемането на желязо (ferric uptake regulator – FUR) в HP бактерии, микроорганизмът може да причини дефицит на микроелемента в гостоприемника, особено ако е наличен и прием на храна, бедна на желязо (Pich and Merrell, 2013). Освен това FUR функционира като главен регулатор на генната експресия на множество белтъци и ензими, имащи отношение към метаболизма и енергетиката на HP бактерии, включително и на CagA. CagA, от своя страна, играе също важна роля за поддържане хомеостазата на желязото в HP бактерии, чрез промяна на желязния метаболизъм в ендотелните гастрални клетки на гостоприемника (Flores et al., 2017). Всеизвестен е фактът, че свободното желязо, несвързано с белтък, участва в реакцията на Fenton и стои в основата на запускане на процесите на генериране на ROS. Твърде възможно е промяната в желязния метаболизъм на гостоприемника, вследствие на HP инфекция, да довежда до повишени нива на свободното, несвързано с белтък желязо, въпреки намаляването на общата му

серумна концентрация. В подкрепа на тази хипотеза е и изследваната корелационна зависимост между серумни нива на желязо и генериране на ROS в групата с НР(+) гастрити, онагледена на фигура 19. Тази зависимост е не само отрицателна и статистически значима, но умерена по сила. Промените в хомеостазата на желязото, причинени от НР инфекция, увеличават чувствителността на макроорганизма към окислително увреждане на стомашната лигавица.



Фигура 19. Корелационна зависимост между серумни нива на желязо и серумни нива на ROS при пациенти с НР(+) гастрити

Приложен е параметричен анализ поради нормално разпределение на стойностите и изчислен Pearson r коефициент ROS се определят посредством dROMs теста,

Ендоскопското изследване е най-информативният и директен метод за поставяне на диагноза хроничния гастрит. Приема се за златен стандарт, който дава визуална оценка на степента на лигавичните промени, както и тяхната локализация в гастро-дуоденума. Изследването на биомаркери в достъпни и неинвазивно добити биологични материали, които да се асоциират с протичането на възпалението в стомашната мукоза и да корелират с ендоскопската находка, са от изключителна важност за мониториране хода на хроничния гастрит.

Резултатите от извършения корелационен анализ между основните параметри, изследвани в слюнката, и степента на ендоскопската увреда са показани на Таблица 26. За нито един от слюнчените показатели не се установява статистическа значимост на изследваните корелационни връзки. Единствено за UA се наблюдава тенденция за статистическа значимост на слабо изразената отрицателна корелационна връзка между нивата ѝ в слюнка и ендоскопските промени. Това наблюдение би могло отново да подчертае хипотезата, че в резултат на хроничното възпаление на стомашната лигавица и оксидативния стрес се намаляват нивата на UA в слюнка, като естествен неин антиоксидант.

Таблица 26. Корелационни взаимовръзки между степента на ендоскопските възпалителни промени в стомашната лигавица и изследваните параметри в слюнката при пациенти с НР(+) инфекция

Параметър	Корелационен коефициент	<i>p</i> value
UA	Pearson $r=-0.276$	0.066
TP	Pearson $r=-0.032$	ns
ALB	Pearson $r=0.213$	ns
sIgA	Pearson $r=-0.140$	ns
LDH	Spearman $r=0.253$	0.094
sAA	Spearman $r=-0.131$	ns
Нитрити	Spearman $r=0.174$	ns

*Приложен е параметричен корелационен анализ (за параметри с нормално разпределение на стойностите) и непараметричен корелационен анализ (за параметри с негаусово разпределението на стойностите) и изчислени съответни коефициенти – Pearson *r* и Spearman *r* коефициент)*

Обратно, слюнчените албумин и LDH показват слаба положителна корелация с ендоскопската находка, но също така статистически незначима. Би могло да се заключи, че самостоятелното използване на слюнчените параметри носи малка информативна стойност, но в констелация с други параметри биха могли да повишат информативността относно ендоскопските възпалителни промени в стомашната мукоза.

Доказаните както повишено генериране на ROS, така и намален АОС при НР(+) гастрити корелират в умерена степен и статистически значимо, съответно положително и отрицателно, с ендоскопските промени в стомашната лигавица (таблица 27). Това е поредното доказателство за значението на оксидативния стрес като основен патофизиологичен механизъм при хроничното възпаление, обуславящ и степента на ендоскопските промените в стомашно-дуоденалната лигавица.

Таблица 27. Корелация между степента на ендоскопските възпалителни промени и серумните параметри за генериране на ROS и антиоксидантен капацитет при пациенти с НР(+) инфекция

Параметър	Корелационен коефициент	<i>p</i> value
dROMs	Pearson $r=0.458$	0.004
ВАР	Pearson $r=-0.498$	0.002

*Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson *r* коефициент dROMs – реактивни кислородни метаболити; ВАР-биологичен антиоксидантен потенциал*

5.6. Диагностичен потенциал на изследваните слюнчени и серумни параметри при хроничните гастрити

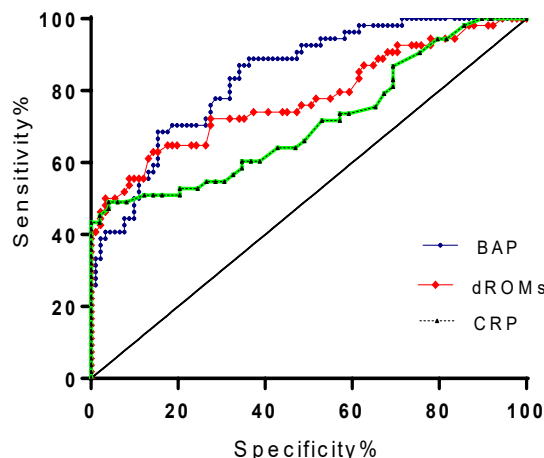
Във връзка с оценката на диагностичния потенциал на избраните серумни и слюнчени параметри и възможността им да разграничават болни (пациенти с хроничен гастрит) от здрави (контролна група) е осъществен ROC анализ, резултатите от който са посочени на таблица 28.

Таблица 28. Диагностичен потенциал на избрани серумни и слюнчени параметри

Параметър в серум	AUC	95% CI	p value
BAP	0.840	0.776÷0.904	<0.0001
dROMs	0.779	0.695÷0.863	<0.0001
CRP	0.711	0.611÷0.811	0.0003
Параметър в слюнка	AUC	95% CI	p value
LDH	0.903	0.851÷0.955	<0.0001
ALB	0.834	0.755÷0.913	<0.0001
Нитрити	0.775	0,694÷0,856	<0.0001
sIgA	0.731	0.639÷0.824	<0.0001
sAA	0.752	0,665÷0,839	<0.0001
TP	0.689	0,610÷0,767	<0.001
UA	0.560	0.460÷0.660	ns

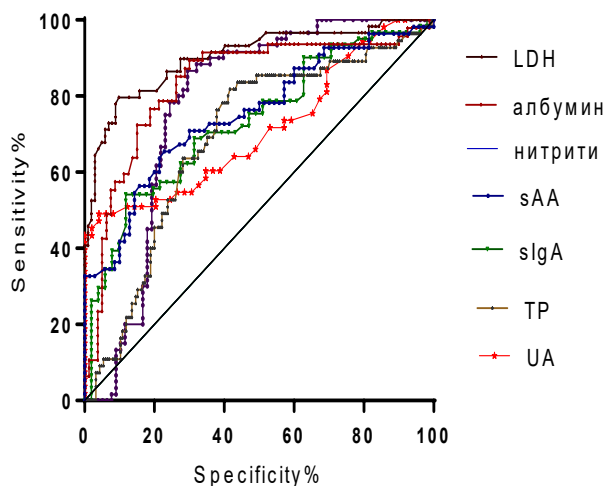
*Изследвани са пациентите с хронични гастрити спрямо контролната група здрави лица
AUC – площ под кривата; CI – доверителен интервал*

На фигура 20 са визуализирани данните от ROC анализа на серумните показатели. От изследваните серумни параметри се установява, че двата теста, свързани с оксидативния стрес, имат по-голяма площ под кривата (AUC) в сравнение с рутинно използвания в клинично-лабораторната дейност CRP, което потвърждава идеята, че тези два показателя са подходящи за мониториране на пациентите с хронични гастрити.



Фигура 20. ROC криви и AUC на серумни показатели за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица
 (Площта под кривата на съответните показатели са дадени в таблица 41)
dROMs – Реактивни кислородни метаболити; *BAP*- Биологичен антиоксидантен потенциал

На фигура 21 са визуализирани данните от ROC анализа на множество слюнчени показатели. Установява се, че няколко от тях (*LDH* и албумин) имат доста голяма площ под кривата (*AUC*: 0.903, 0.834), говорещо за много добра диагностична надеждност на тези показатели.

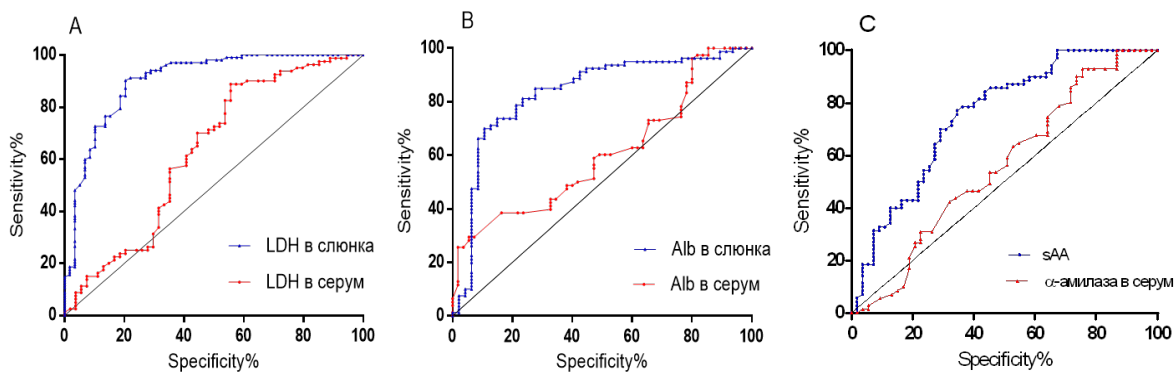


Фигура 21. ROC криви на избрани слюнчени биохимични параметри за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица
 (Площта под кривата на съответните показатели са дадени в таблица 41)
sAA- саливарна алфа-амилаза; *sIgA*- секреторен имуноглобулин А

Част от изследваните слюнчени показатели (нитрити, *sIgA* и *sAA* и белтък) имат сравнително голяма площ под ROC кривата (*AUC*: 0.775, 0.752, 0.731 и 0.689 съответно). Тези показатели биха могли да имат важно диагностично значение, особено ако се изследват заедно с някой от показателите от предходната група. Стойността на *AUC* за *UA* е 0.560, което говори, че изследването ѝ в слюнка не е

особено надежден показател при мониториране на пациентите с хронични гастрити.

За оценката на възможността слюнката да бъде използвана като неинвазивен и достъпен биологичен материал при разграничаване на болни (пациенти с хроничен гастрит) от здрави (контролна група) са сравнени ROC кривите на диагностичния потенциал на изследваните параметри в слюнка спрямо тези в серум. На фигура 22 (А, В, С) са визуализирани данните от ROC анализа за LDH, албумин, алфа-амилаза.



Фигура 22. ROC криви на слюнчените и серумни биохимични параметри LDH, албумин и алфа-амилаза за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица

А. Площ под ROC кривата за LDH (AUC за слюнка 0.903, $p < 0,0001$ срещу AUC за серум 0.630, $p = 0,011$); **В.** Площ под ROC кривата за албумин (AUC за слюнка 0.834, $p < 0,0001$ срещу AUC за серум 0.603, $p = 0,044$); **С.** Площ под ROC кривата за алфа-амилаза (AUC за слюнка 0.752, $p < 0,0001$ срещу AUC за серум 0.56, ns)

Направеният анализ показва значимо по-високи стойности на AUC за слюнчените LDH и албумин спрямо серумните, с което може да се заключи, че тяхното изследване в слюнка като алтернативен неинвазивен биологичен материал е подходящо за мониториране на пациентите с хронични гастрити.

За останалите показатели (sIgA/IgA, UA и TP), направения сравнителен ROC анализ на слюнчена и серумна диагностична надеждност не показва предимство на слюнчения показател като алтернативен в диагностичния процес. Така площта под ROC кривата за sIgA е 0.732, $p < 0,0001$ срещу тази на серумния IgA AUC 0.663 $p = 0,003$; площта под ROC кривата на слюнчения TP е съответно 0.689 $p < 0,0001$ срещу AUC на серумния белтък- 0.581 $p = ns$; площта под ROC кривата за слюнчената UA спрямо тази на серума са съответно 0.560 $p = ns$ и 0.581 $p = ns$.

6. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания

Хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) се отнасят към група идиопатични заболявания на червата, които се характеризират с хронично-рецидивиращ ход. Двата най-често срещани вида ХВЧЗ са улцерозен колит (УК), засягащ обикновено дебелото черво, и болестта на Крон (БК), която може да включи всички сегменти на стомашно-чревния тракт (от уста до анус). Както УК, така и БК са имуно-медиирани заболявания с мултифакторна патогенеза, състояща се от сложни взаимовръзки между нарушени имунни отговори, генетично предразположение, рискови фактори на околната среда и дефекти на епителната бариера. ХВЧЗ засягат главно млади хора в активна възраст. Обострянето на заболяването възниква предимно непредсказуемо, а постоянната инфламаторна активност се отразява негативно на физическото и психическото благосъстояние на пациента, водещо до понижена работоспособност и социалната изолация (Liverani et al., 2016). Фазите на обостряне са с различна продължителност и интензивност и могат да доведат до тежки усложнения – фисури и абсцеси, мегаколон, полипоза, чревни перфорации и др.

6.1. Характеристика на пациентите с ХВЧЗ

Диагнозите УК и БК на изследваните пациенти са поставени на базата на критериите на ECCO Consensus 2019, година (European Crohn's and Colitis Organisation), включващи комплекс от анамнестични, клинични, лабораторни и инструментални изследвания. Рутинно измерваните възпалителни маркери като С-реактивен протеин (CRP), скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) и брой на белите кръвни клетки (WBC) са признати за важни лабораторни параметри както за първоначалната диагностика, така и за мониторирането на активността на заболяването, въпреки че не са специфични за чревно възпаление (Spiceland and Lodhia, 2018; Vermeire et al., 2004). Активността на заболяването при пациентите с ХВЧЗ е изчислена съгласно индекса на Best – Crohn's disease activity index (CDAI) за пациентите с БК и индекса на Mayo – за пациентите с УК. Според тези индекси включените в проучването пациенти с ХВЧЗ са разделени на две подгрупи – пациенти с активна форма на заболяването (CDAI > 220 и Mayo индекс ≥ 2) и такива с лека форма или в ремисия.

Обобщени демографски данни и данни за клиничната активност (обостряне или ремисия) при пациентите с ХВЧЗ са представени на таблици 29, а видът терапевтичен режим – на таблица 30.

Таблица 29. Демографски и клинични характеристики на пациентите с ХВЧЗ

Изследвани лица	Пациенти с умерена/тежка степен	Пациенти с лека степен/ремисия	Общо
Пол			
мъже, n (%)	18 (33.3%)	6 (11.1%)	24 (44.4%)
жени, n (%)	18 (33.4%)	12 (22.2%)	30 (55.6%)
Пациенти с УК			
n (%)	28 (51.9%)	12 (22.2%)	40 (74.1%)
възраст в години (mean±SD)	44.1±14.9	50.3±13.3	47.1±15.2
Пациенти с БК			
n (%)	8 (14.8%)	6 (11.1%)	14 (25.9%)
възраст в години (mean±SD)	39.0±8.2	33.2±5.49	36.9±7.9
Общо			
n (%)	36 (66.7%)	18 (33.3%)	54 (100%)
възраст в години (mean±SD)	41.5±13.9	44.5±14.1	43.9±14.7

Таблица 30. Вид терапевтичен режим при пациенти с ХВЧЗ

Терапевтичен режим	n (брой)
Монотерапия	
5-ASA (Salofalk)	12
Биологична терапия – анти α -TNF (Infliximab)	1
Комбинирана терапия	
5-ASA (Salofalk) + Антибиотик + Кортикостероиди	20
5-ASA (Salofalk) + анти α -TNF (Infliximab)	21
Общо	54

По отношение на клиничната симптоматика пациентите са имали повтарящи се епизоди с продължителност повече от 4 седмици и с оплаквания от болки в корема, диарични изхождания, примесени с кръв и слуз, температура и загуба на тегло. Оплакванията са или персистиращи или се възобновяват епизодично с честота над 2 пъти годишно. Средната продължителност на заболяването при изследваните пациенти е 7.44 ± 9.51 години, с диапазон от 1 до 31 години, като 6 от тях са новооткритите (11.1%). При 18 пациента (33.3%) се наблюдава поне едно усложнение (най-често абсцес, фистула или полипоза), заради което се е наложила оперативна намеса. Средната продължителност на протичане на заболяването при тези пациенти е 11.2 ± 8.9 години с диапазон от 2 до 31 години. При 5-ма от изследваната група (9.3%) се наблюдават и извънчревни прояви като артропатия и конюнктивити.

6.2. Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при ХВЧЗ и оценка на диагностичния им потенциал

Устната кухина е свързана морфо-функционално и филогенетично с гастроинтестиналния тракт и реагира с промени при много засягащи го заболявания. От друга страна тя се явява входна врата за проникване на различни инфекции, повлияващи общото здраве. При активно протичащите форми на ХВЧЗ се наблюдава по-голям брой орални проблеми, което може да се дължи на дисфункция на слюнчените жлези (de Vries et al., 2018, Johannsen et al., 2015). Редица изследователи съобщават, че слюнката на пациенти с ХВЧЗ се различава по състав (повишени нива на много възпалителни цитокини, имуноглобулин А, относително изобилие на някои бактериални видове и по-ниско ниво на лизозим) и има различни имунологични свойства (Said et al., 2014).

На включените в проучването индивиди, формиращи пациентската и контролна групи, са изследвани подбрани показатели в слюнка и серум, свързани с възпалението, оксидативния стрес и имунологичните механизми на защита, представени съответно на таблици 31 и 32.

Таблица 31. Изследвани слюнчени параметри при пациенти с ХВЧЗ в сравнение с контролната група

Параметри (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
UA [$\mu\text{mol/L}$] (145÷320)	174.2±28.3	212.3±58.8	221.4±53.6	p*=0.029 p**<0.0001 p***=ns
TP [mg/L] (410÷1177)	883.1±162.3	724.8±183.1	717.7±273.3	p*=0.047 p**<0.001 p***=ns
ALB [mg/L] (29.5÷82.4)	67.6±14.9	53.5±11.0	52.1±29.5	p*=0.031 p**=0.004 p***=ns
sIgA [mg/L] (67.8÷144.6)	73.8±23.4	103.0±30.9	118.1±52.1	p*=0.003 p**<0.0001 p***=ns
LDH [U/L] (96÷360)	326.4±194.3	170.1±19.9	148.6±71.9	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=ns
sAA [U/mL] (17.62÷79.95)	97.7±77.5	60.10±44.8	59.3±30.3	p*=0.048 p**=0.012 p***=ns
Нитрити [$\mu\text{mol/L}$] (25÷121)	115.1±76.6	74.5±24.3	78.6±61.3	p*=0.042 p**=0.019 p***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p* – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)

Таблица 32. Изследвани серумни параметри при пациенти с ХВЧЗ в сравнение с контролната група

Параметри (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
UA [μmol/L] (154÷420)	365.3±61.6	334.4±54.7	310.0±63.0	p*=0.014 p**<0.0003 p***=ns
TP [g/L] (66÷85)	65.4±6.2	66.3±5.5	73.3±5.5	p*=ns p**<0.0001 p***<0.0001
ALB [g/L] (36÷52)	38.9±5.2	40.5±4.6	46.9±4.0	p*=ns p**<0.0001 p***<0.0001
IgA [g/L] (0.70÷4.0)	2.53±1.3	2.46±0.7	1.9±0.9	p*=ns p**=0.032 p***=0.048
LDH [U/L] (120÷240)	228.4±53.8	215.1±46.6	180.5±30.3	p*=ns p**<0.0001 p***=0.002
α-amylase [U/L] (30÷100)	66.2±19.1	67.2±17.2	65.6±15.9	p*=ns p**=ns p***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)*

Обсъждане на резултатите

Ксеростомията (субективното усещане за сухота в устата) и хипосаливацията (обективно намаляване на скоростта на слюнчен поток) са често срещани при пациенти с ХВЧЗ, дължащи се не само на дехидратацията в следствие на диаричния синдром, но и на непрекъснато прилаганите медикаменти като 5-aminosalicylic acid (5-ASA) и имunosупресори, което водят до промени в биохимичния състав на слюнката.

В настоящето проучване се наблюдава статистически значимо снижени стойности на слюнчената UA при пациентите в активна форма на заболяването спрямо тези в ремисия или лека форма (p=0.029) и спрямо контролната група (p<0.0001). Разлика липсва между пациентите в ремисия или лека форма и контролната група (p=0.865). Добре известно е, че оксидативният стрес играе съществена роля в патогенезата и прогресирането на ХВЧЗ (Tian T. et al., 2017), а резултатите от нашето проучване навеждат на мисълта, че оксидативният взрив е значимо по-голям при пациентите с активна форма на заболяването, което от своя

страна води и до съответно понижаване на основния антиоксидант в слюнката, а именно UA. Средната стойност на слюнчената UA в тази група попада в долния диапазон на определените от нас референтни граници, като една пета от тях са със стойности под долна референтна граница. В литературата данните за слюнчената UA и значението ѝ за ХВЧЗ са твърде ограничени. Rezaie и сътр. (2006), изследвайки промените в слюнката, свързани с ОС, установяват също, че при пациентите с БК стойностите на UA и други антиоксиданти като албумин, трансферин и тиолови молекули са значимо по-ниски в сравнение с тези на контролната им група, но не успяват да докажат корелация с тежестта на заболяването (CDAI

В научната литература се намират редица данни относно повишени серумни нива на UA при ХВЧЗ. Така например Tian S. и сътр. (2018), изследвайки пациенти с улцерозен колит установяват статистически значимо повишение на UA, но не установяват взаимовръзка между стойностите ѝ и клиничния стадий. Резултатите от настоящото проучване показват статистически значимо по-високи серумни нива на UA в пациентската група с активна форма на заболяването спрямо тези с ремисия/лека форма ($p=0.014$), както и с контролните индивиди ($p=0.0003$). Въпреки това стойностите остават в референтните граници. Интересно е, че серумните нива на UA при пациентите от втората подгрупа не се различават значимо от тези в контролната група ($p=0.093$). Причина за покачването на серумната UA може да се обясни от една страна с намалена ѝ чревна екскреция, а от друга с увеличено ѝ производството от колонизацията на чревния тракт с *S. cerevisiae* при пациентите с активен стадий на ХВЧЗ.

В научната литература данните относно нивата на слюнчения TP при ХВЧЗ са твърде оскъдни. Така например Said и сътр. (2014), изследвайки саливарната микробиота при пациенти с БК и УК, докладват, че няма значима разлика в концентрацията на общия протеин в слюнката при изследваната пациентска и контролна група, докато Hasan и сътр. (2012), обратно, откриват значимо по-високи стойности на слюнчения белтък. Резултатите от нашето проучване са в съгласие с тези на последния екип. Макар и средната стойност на TP в слюнка от пациенти с тежка форма на заболяването да попада в горно-граничната област на определения от нас референтен интервал, се установяват статистически значимо по-високи стойности в сравнение с тези в лека форма или ремисия ($p=0.047$), както и спрямо индивидите от контролната група ($p<0.001$). Нивата на TP в групата в ремисия или лека форма на заболяването не се различават съществено от тези в контролната група. Очевидно е, че при пациентите с активна форма на заболяването тежката клинична картина, съпроводена с дехидратация, диселектролитемия и хипопротеинемия води до

намален слюнчен поток, обуславящ по-високите нива на тоталния протеин в слюнката. Докато липсващата или лека симптоматика при втората подгрупа пациенти не води до съществени различия в нивата на слюнчения белтък.

За разлика от слюнчените нива на TP, серумните не се явяват добър дискриминатор за активност на заболяването – липсва статистически значима разлика в серумните нива между двете пациентски подгрупи ($p=0.805$). Независимо от степента на активност и в двете пациентски подгрупи средните стойности на TP се различават статистически значимо от контролната група ($p<0.0001$) и са на долна референтна граница, като при почти половината от тях (26 пациента) нивата попадат в патологично ниския диапазон. Хипопротеинемията, дължаща се на безапетитието и нарушеното храносмилане и абсорбция в чревния тракт, е характерна за налично ХВЧЗ, но трудно би могла самостоятелно да категоризира степените на активност на заболяването.

Изключително малко и противоречиви са данните в литературата за саливарния **албумин** и промените му при ХВЧЗ. Така например Hasan и сътр. (2012) докладват за незначимо покачване на саливарния ALB в група лица с цъолиакция, докато Rezaie и сътр. (2006) установяват статистически значимо пониски стойности при пациенти с активна форма на БК. В настоящото проучване резултатите за слюнчения ALB са сходни с тези за общия белтък в слюнка – статистически значимо по-високи стойности при пациентите с активна форма в сравнение с тези при пациентите с лека форма ($p=0.031$) и при контролната група ($p=0.004$) и липса на значима разлика между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди ($p=0.833$). Вероятно промяната се дължи както на дехидратацията и намаления слюнчен поток, така и на повишена пропускливост на базалната мембрана на слюнчените жлези, по-изразени в активната фаза на болестта. Въпреки статистическите различия с контролната група, стойностите на слюнчения ALB в двете пациентски групи попадат изцяло в референтният диапазон.

И резултатите за серумните нива на албумин повтарят тези на серумния общ белтък – установяват се статистически значимо пониски стойности и за двете пациентски подгрупи спрямо контролната група ($p<0.0001$), но липсва различие между тях самите ($p=0.694$). Освен нарушеното хранене и малабсорбция, но и хроничният възпалителен процес, водещ до намален синтез в черен дроб на албумин (като негативен острофазов белтък) и до повишен катаболизъм спомагат за хипоалбуминемията при ХВЧЗ. Освен това албуминът се причислява към т.нар. неензимни протеинови антиоксиданти и редица автори намират също спад в концентрациите му при ХВЧЗ, независимо от вида и активността на заболяването (Yuksel et al., 2017; Su Q et al., 2019). В нашето проучване 16 пациента (30%) общо

за двете пациентски групи са със стойности под референтните граници за албумин в серум. Khan и сътр. (2017) установяват, че нива на серумен албумин ≤ 35 g/L при ново диагностицирани пациенти с УК е лош прогностичен показател, а също са и предиктивни за неуспех на лечението и настъпване на ранни усложнения (колектомия). Освен това Thara и сътр. (2016) смятат, че изразената хипоалбуминемия в хода на заболяването е свързано с тиопуринова недостатъчност и липса на отговор на анти-TNF терапия при пациенти с УК.

Слюнката съдържа различни компоненти като цитокини, имуноглобулини и антимикробни протеини, участващи в редица защитни механизми на гостоприемника за поддържане на оралното и системно здраве. Иmunната система играе важна роля за развитието и прогресията на ХВЧЗ. Описана е връзка между ниския sIgA и по-висок риск от автоимунни заболявания, такива като болест на Крон, цьолиакия, системен лупус еритематодес, туморни процеси и др. (Phillips et al., 2015; Ahmadiafshar et al., 2015). Открити са и намален брой на В-лимфоцитите, продуциращи IgA и увеличен брой на В-лимфоцитите, продуциращи IgG при стомашно-чревни възпалителни заболявания (Brandtzaeg, 2010). Резултатите от настоящото проучване показват значимо намаляване на стойностите на sIgA при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение със стойностите му както при пациенти с лека форма на ХВЧЗ ($p=0.003$), така и при контролната група ($p<0.0001$), докато статистическо различие между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди липсва. Важно е, да се спомене, че 50 % от болните в активност на заболяването имат стойности под долна референтна граница. Може да се предположи, че тези по-ниски нива на sIgA са свързвани с активността на заболяването и отразяват намаления имунен отговор в лигавиците, хроничната възпалителна реакция, увеличаване на оксидативен стрес и дисбактериоза във фазата на активност (Phillips et al., 2015). Секреторният IgA не само зависи от антигенната стимулация, но също така е под силен невроендокринен контрол. Редица фактори като стрес, емоционални и физически натоварвания, могат да се окажат възможни инициатори за поява на ХВЧЗ и/или за активиране на възпалението с повлияване нивата на sIgA (Teeuw et al., 2004; Gillum et al., 2014).

Серумните концентрации на IgA при ХВЧЗ пациенти както с активна, така и с лека форма на заболяването или в ремисия са статистически значимо по-високи спрямо контролната група (съответно $p=0.032$ и $p=0.048$), но не се различават помежду си ($p=0.873$). Повишените нива на IgA вероятно се обясняват с имунологична пренастройка на макроорганизма. Така например няколко проучвания показват, че имунната система при ХВЧЗ реагира срещу много от микроорганизмите, съставляващи нормалната микрофлора на червата с образуване на специфични антитела ASCA и pANCA от клас IgA и IgG (Kuna,

2013; Mitsuyama et al., 2016). Нашите данни са в съгласие с изследванията на Ahmad и сътр. (2019), които установяват при пациентите с УК и БК значително повишени концентрации на IgG и IgA в сравнение със здрави контроли. Хроничният възпалителен процес води до промяна в серумните нива на IgA, но те остават в границите на референтния интервал. Това доказва, че спрямо циркулиращите серумни нива на IgA, намаляващите стойности на sIgA имат по-съществено значение при имунните нарушения в ГИТ.

Хроничният възпалителен процес играе роля за инфилтриране на оралната мукоза с левкоцити и засилено излющване на епителни клетки, което обуславя увеличения им брой в оралната течност. Достига се и до по-висока активност на ензима LDH, свързана с некрозата на тези клетки. В научната литературата са ограничени данните за промените в слюнчената LDH при ХВЧЗ. В настоящото проучване се наблюдават най-високи стойности на ензима в пациентската група с активна форма на заболяването, статистически значимо различни спрямо тези на контролната група ($p < 0.0001$), както и спрямо тези на пациентите с лека форма на заболяването или в ремисия ($p < 0.0001$). От своя страна, последните не се различават значимо от тези на контролната група ($p = 0.655$). Прави впечатление, че за разлика от другите две групи средната стойност на слюнчените нива на ензима в групата с активност на заболяването е в горно-граничната област на определените в нашето проучване референтни граници, като при 23 % от пациентите нивата са извън референтния интервал.

Що се касае до серумните концентрации на LDH при ХВЧЗ, Conrad и сътр. (2002) и El-Kareem и сътр. (2006) установяват, че както ензимът LDH, така и СУЕ и CRP са значимо повишени като израз на неспецифичен отговор спрямо имуномедианото възпаление при УК. Резултатите от настоящото проучване са в съгласие с тези от литературата, като нивата на серумната LDH при пациентите както с активна, така и с лека форма на заболяването или в ремисия са статистически значимо по-високи спрямо тези на контролната група (съответно $p = 0,0001$ и $p = 0.002$), но не се различават помежду си ($p = 0.873$). Въпреки това те са все още в референтни граници.

Слюнчената **алфа-амилаза (sAA)** също търпи статистическо значимо повишение при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение с пациентите с лека форма или в ремисия ($p = 0.048$), както и в сравнение с контролната група ($p = 0.012$). Отново не се установява статистическа значима разлика в стойностите на sAA в последните две групи ($p = 0.985$). Трябва да се отбележи, че това е единственият слюнчен показател, чиято средна стойност за групата с висока активност на заболяването попада извън определените от нас референтни граници в нестимулирана слюнка. Въпреки широките граници на

вариации в активността на този ензим, за 33% от пациентите в тази група са установени патологично повишени стойности. Може да се предположи, че слюнчените жлези увеличават секрецията на sAA по време на възпаление, за да защитят устната кухина. Стресът и болката, които придружават обострянето на заболяването, намаляват скоростта на слюнчения поток и увеличават секрецията на ензима. Активирането на симпатикусовата нервна система играе важна роля в медирането на чревното възпаление, като се смята, че тя има провъзпалителни свойства, докато парасимпатикусовата нервна система притежава противовъзпалителни свойства (Straub et al., 2006).

В настоящето проучване серумните стойности на ензима алфа-амилаза са в референтни граници и при трите изследвани групи, като не се установява различие между тях. Само трима пациента са с повишени стойности на серумната амилаза, без това да е съпроводено с клинична симптоматика за панкреатит. В сравнение със sAA, серумната алфа-амилаза не е подходящ показател за мониториране на ХВЧЗ.

Във физиологични концентрации азотният оксид (NO) е важна молекула, участваща в защитата и хомеостазата на гостоприемника като модулира възпалителния отговор. В патологично повишени концентрации играе важна роля за прогресирането на хроничните възпалителни заболявания, включително и тези на червата. Резултатите от настоящето проучване показват статистически значимо увеличени стойности на **нитритите** в слюнката при пациенти с активна форма на ХВЧЗ в сравнение с тези с лека форма или в ремисия ($p=0.042$), както и в сравнение с контролната група ($p=0.019$). Още повече, че средната стойност на слюнчените нитрити при пациентите с активна форма са горно гранични, като приблизително една трета от тях са извън определените от нас референтни граници. Интересно е, че липсва значима разлика между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди ($p=0.884$). Вероятно стихването на възпалителният процес на чревната лигавица води до уеднаквяване нивата на слюнчените нитрити при тази пациентска група спрямо контролната група. В подкрепа на нашите резултати са и множество данни от научната литературата. Jahanshahi и сътр. (2004), изследвайки пациенти с ХВЧЗ, установяват високи стойности на NO в слюнката както при пациенти с БК, така и при пациенти с УК. Макар че слюнчените жлези вземат активно участие в екзогенния път за синтез на NO, при ХВЧЗ превес има ендогенния път за сметка на по-голямата експресия на ензима iNOS и генериране на RNS, които допринасят за развитието и поддържането на хроничното възпаление при ХВЧЗ. iNOS стимулира производството на TNF- α в лигавицата на средната и дисталната част на дебелото черво, с което потенцира инфилтрацията на имунни клетки. Тлеещата

възпалителната реакция в чревната лигавица се придружава от загуба на чревните бокални клетки, хиперплазия на криптите, намалено производство на мукус и улцеративни промени. В научната литература се срещат публикации, в които е установено повишено съдържание NO както в аспирират от дебелочревно съдържимо, така и в издишания въздух при пациенти с ХВЧЗ (Koeck et al., 2002; Ikonomi et al., 2016), което е в подкрепа на значението на ендогенния път за синтез на NO и засиления му ентеросаливарен кръговрат.

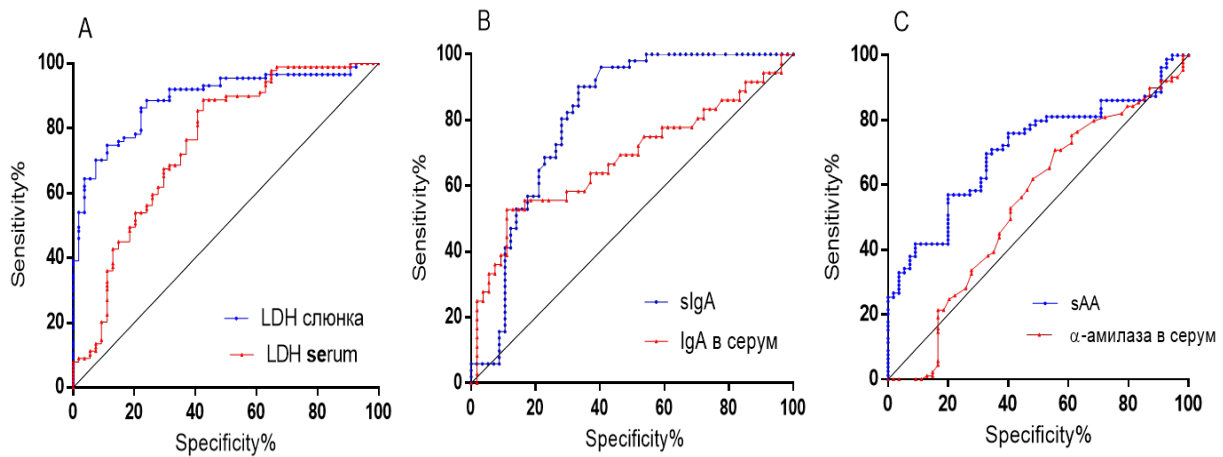
За да се прецени диагностичния потенциал на изследваните слюнчени показатели е проведен ROC анализ, данните от който са представени на табл. 33.

Таблица 33. Диагностичен потенциал на избрани слюнчени параметри при пациенти с ХВЧЗ

Параметър	*AUC за показателя в слюнка	**95% CI	p value
LDH	0.899	0.838÷0.945	<0.0001
sIgA	0.810	0.725÷0.894	<0.0001
sAA	0.709	0.622÷0.796	<0.0001
ALB	0.706	0.644÷0.772	<0.0001
UA	0.687	0.602÷0.771	<0.0001
нитрити	0.654	0.561÷0.732	0.002
TP	0.587	0.50÷0.675	0.05

*AUC – площ под кривата; **CI – доверителен интервал

От всички изследвани слюнчени параметри с най-голяма площ под кривата се характеризират LDH и sIgA, говорещо за много добър диагностичен потенциал на тези слюнчени показатели. Показателите sAA и албумин се представят с една междинна стойност на AUC, а UA, нитрити и TP – с най-ниски стойности. За параметрите, които имат най-голяма стойност на AUC е осъществен допълнителен сравнителен ROC анализ (слюнка/серум), за да се прецени дали те са по-надеждни от съответните серумни показатели и възможността слюнката да бъде използвана като неинвазивен и достъпен биологичен материал при разграничаване на болни (пациенти с ХВЧЗ) от здрави индивиди (контролна група). Резултатите от този анализ са визуализирани на фигура 23 А, В, С.

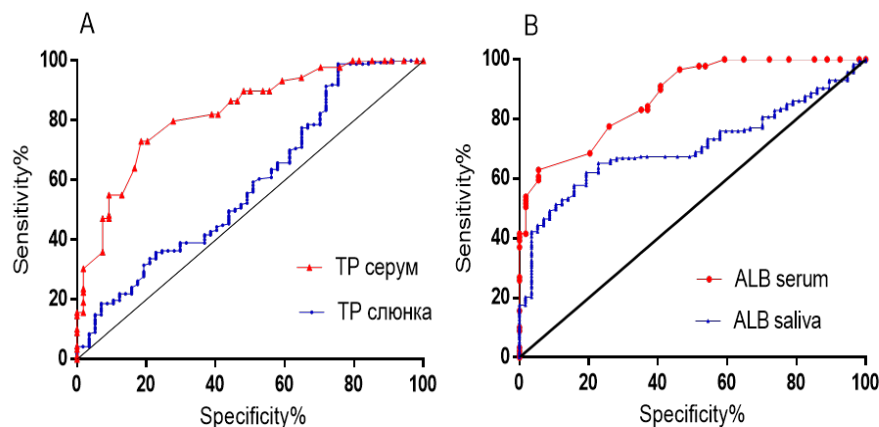


Фигура 23. ROC криви на LDH, sIgA и sAA в слюнка в сравнение с ROC кривите на LDH, IgA и алфа-амилаза в серум при пациенти с ХВЧЗ

А. Площ под ROC кривите за LDH (AUC за слюнка 0.899, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.755, $p = 0.001$); **В.** Площ под ROC кривите за sIgA (AUC за слюнка 0.810, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.651, $p = 0.04$); **С.** Площ под ROC кривите за sAA (AUC за слюнка 0.701, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.543, $p > 0.05$)

На фигура 23 ясно се вижда, че посочените слюнчени параметри (LDH, sIgA и sAA) имат по-голяма площ под кривата в сравнение със съответните серумни показатели, с което се потвърждава по-добрият им диагностичен потенциал.

За разлика от тях, слюнчените TP и ALB показват по-малка площ под кривата, съответно по-слаб диагностичен потенциал в сравнение със серумните TP и ALB, рутинно използвани в клиничната практика относно диагностиката и проследяването на тежестта на ХВЧЗ (фиг. 24 А и В).



Фигура 24. ROC криви на TP и ALB в слюнка в сравнение с ROC кривите на TP и ALB в серум при пациенти с ХВЧЗ

А. Площ под ROC кривите за TP (AUC за слюнка 0.587, $p = 0.05$ срещу AUC за серум 0.825, $p < 0.0001$); **В.** Площ под ROC кривите за ALB (AUC за слюнка 0.706, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.890, $p < 0.0001$)

6.3. Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с ХВЧЗ

Като имуномедиирани заболявания БК и УК ангажират не само чревната лигавица, но могат да имат и извънintestinalни прояви в устната кухина и други органи (стави, кожа, очи, жлъчни пътища). Оралните лезии, като клинична проява имат честотата варираща от 5% до 30%, като най-често се наблюдават при болестта на Крон под формата на хейлит, улцерации, фисури и глосит (Padmavathi et al., 2014, Lankarani et al., 2013). Устните прояви в 5% до 10% от случаите могат да бъдат първият признак на заболяването и дори да предшестват появата на чревни лезии (Plauth et al., 1991). Тези находки в устната кухина могат да спомогнат за диагностициране и наблюдение на активността на процеса при ХВЧЗ (Danese et al., 2005; Muhvić-Urek et al., 2016).

За да се разкрие отражението на хроничния възпалителен чревен процес върху промените в устната кухина, в настоящото проучване се изследва и слюнченият клетъчен състав на нестимулирана слюнка. Данните за отделните видове клетки и сравнението между отделните групи са представени в таблица 34.

Таблица 34. Клетъчни елементи в нестимулирана слюнка в трите изследвани групи

Клетки [cells/ μ L] (референтни граници)	Активна форма на ХВЧЗ (mean \pm SD)	Лека форма/ ремисия (mean \pm SD)	Контролна група (mean \pm SD)	<i>p</i> value
RBC (14.0÷156.0)	107.4 \pm 40.4	105.6 \pm 50.4	78.1 \pm 40.7	<i>p</i> *=ns <i>p</i> **=0.006 <i>p</i> ***=0.023
WBC (58÷451.0)	505.4 \pm 207.0	405.9 \pm 108.7	287.8 \pm 188.7	<i>p</i> *=0.064 <i>p</i> **<0.0001 <i>p</i> ***=0.004
EC (104 ÷698)	673.4 \pm 264.8	552.8 \pm 230.8	509.0 \pm 207.0	<i>p</i> *=ns <i>p</i> **=0.002 <i>p</i> ***=ns
Bacteria (1810÷5115)	2146 \pm 659.7	2872 \pm 518.9	3018 \pm 1774	<i>p</i> *=ns <i>p</i> **=0.008 <i>p</i> ***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с *One way ANOVA* с корекция на *Bonferroni*. (*p** – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; *p*** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; *p**** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)

Обсъждане на резултатите

Напускайки дуктуса на паротидната жлеза, слюнката не съдържа клетъчни елементи (Klein, 1962). Клетките, намиращи се в оралната течност, се добавят чрез миграция от различни области на устната лигавица.

Въпреки че еритроцитите са най-малобройната група клетки, дори и при тях настъпват промени при ХВЧЗ, според резултатите от настоящото проучване. В двете пациентски групи се установяват статистически значимо по-висок брой RBC спрямо контролната група. Макар и с по-високи стойности, броят на еритроцитите все още попада в определените от нас референтни граници и от тази гледна точка не биха могли да бъдат особено информативни. Може да се предположи, че по-високият брой RBC не се дължи толкова на възпалителния чревен процес, а по-скоро на лекарствените ефекти от постоянната терапия, прилагана както при тежките, така и при леките форми на заболяването. Така напр. е установена повишена пропускливост на съдовете в устната кухина, екхимози и кървене от венците, които често съпровождат моно или комбинирана терапия с инхибитора на TNF- α инфликсимаб (Yuan and Woo, 2015). Това би могло да обясни и липсата на различие в броя на RBC между двете пациентски групи.

В настоящото проучване се установява увеличен брой на ЕС в пациентската група с активна форма на заболяването, който се различава значимо спрямо контролната група ($p=0.002$), но не и спрямо групата с лека форма или ремисия. Прави впечатление, че средните стойности за ЕС в първата група са в горно граничния диапазон на определените от нас референтни граници и приблизително 52% от пациентите имат брой, надвишаващ горната референтна граница. Вероятно хроничното възпаление и ксеростомията, особено през периода на релапс водят да повишена десквамация на букални епителни клетки. По време на възпаление настъпва и миграция на различни бели кръвни клетки. В настоящото проучване се установява статистически значимо по-висок брой на WBC в пациентската група с активна форма на ХВЧЗ и контролната група ($p<0.0001$). Подобно различие се установява и между пациентската група с лека степен/ремисия на заболяването спрямо контролата ($p=0.043$). Наблюдава се тенденция за различие в броя на WBC между двете пациентски групи ($p=0.064$). Трябва да се отбележи още, че средният брой на WBC в пациентската група с активна форма е извън определения от нас референтния интервал (505.4 ± 207.0 при РГ $58\div 451.0/\mu\text{L}$). По тази причина може да се заключи, че би могло да се проследява броят на левкоцитите в слюнка при мониторирането на чревното възпаление и проследяване активността на заболяването.

Устната кухина и стомашно-чревният тракт са силно колонизирани с бактерии, представени главно от нормалната микрофлора, която играе важна роля в активирането на имунната система, регулацията и усвояването на хранителни вещества, контролира производството на витамини и ензими и подобрява антиоксидантните свойства на лигавицата (Kelder et al., 2014). Нарушения в микробната екосистема с намаляването на разнообразието на чревната микробиота са установени при пациенти с УК и БК. Изследването на бактериалните профили при различни орални или системни заболявания се извършва с класическите микробиологични методи или PCR техники за установяване на микробните DNA и RNA. В настоящото проучване се определя само общият брой на бактериите в слюнка с помощта на проточна флоуцитометрия, без да се определя съотношението между различните видове популации микроорганизми. Логично е да се очаква по-висок брой бактерии в слюнката при пациентските групи, но се наблюдава обратното явление – най-висок среден брой на бактериите се открива в контролната група, като броят им намалява при пациентите с ХВЧЗ и парадоксално на пръв поглед, най-нисък среден брой има в групата болни с активност на заболяването. Този факт може да се обясни с антибиотичната терапия, включвана като част от лечението при рецидив на заболяването. Най-вероятно антибиотиците водят до потискане на микрофлората, като намаляват популацията им или водят до дисбактериоза. Тъй като пациентите с лека форма или ремисия не са на антибиотична терапия, средният брой на слюнчените бактерии е близък до този в контролната група. Като се има предвид, че броят на бактериите и в трите изследвани групи влиза изцяло в определените от нас референтни граници, може да се заключи, че този показател няма информативна стойност при пациентите с ХВЧЗ.

6.4. Резултати и обсъждане от изследването на слюнчени и серумни нива на ROS и антиоксидантен капацитет при пациенти с ХВЧЗ, корелационни взаимовръзки с активността на заболяването и оценка на диагностичния им потенциал

Проучванията показват, че при продължителното чревно възпаление се генерират необичайно високи нива на реактивни кислородни и азотни видове (ROS/RNS), предизвикващи белтъчна модификация и ензимна дисфункция, ДНК лезии и нарушена митохондриална биоенергетика и апоптоза, както и увеличена експресия на гени, участващи във вродени и адаптивни имунни отговори в ГИТ (Chen and Gibson, 2008; Alzoughaibi, 2013; Guan and Lan, 2018). Хроничното възпаление и хиперактивността на имунната система води до съответно пропорционално намаление на антиоксидантния капацитет (АОС), с което се

създават условия за дисбаланс между оксиданти и антиоксиданти и възникване на оксидативен стрес.

За по-пълно изясняване на патофизиологичните механизми, развиващи се в хода на възпалителния процес при ХВЧЗ, в настоящето проучване са изследвани dROMs, SAT и BAP тестове в слюнка и серум, които служат като показатели, оценяващи генерирането на ROS и общия AOC. Резултатите от извършените изследвания и установените различия между показателите в трите проучвани групи са посочени в таблици 35 и 36.

Таблица 35. Нива на ROS и AOC в слюнка в трите изследвани групи

Показател (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
dROMs [Ucarr] (58÷70)	78.9±7.9	65.4±4.5	63.3±6.1	p* $<$ 0.0001 p** $<$ 0.0001 p***=ns
SAT [µmol/L] (924.5÷1571)	906±109.5	1158±79.5	1091±195.6	p* $<$ 0.0001 p** $<$ 0.0001 p***=ns

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p* – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)
(dROMS – тест за определяне на ROS; SAT – тест AOC)

Таблица 36. Нива на ROS и AOC в серум в трите изследвани групи

Показател (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
dROMs [Ucarr] (252.4÷463.5)	437.8±131.4	357.0±81.7	341.2±37.48	p* $<$ 0.0001 p** $<$ 0.0001 p***=ns
BAP [µmol/L] (2210÷3400)	2047±608.9	2206±432.8	2683±279.9	p*=ns p** $<$ 0.0001 p*** $<$ 0.0001

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p* – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)
(dROMS – тест за определяне на ROS; BAP – тест AOC)

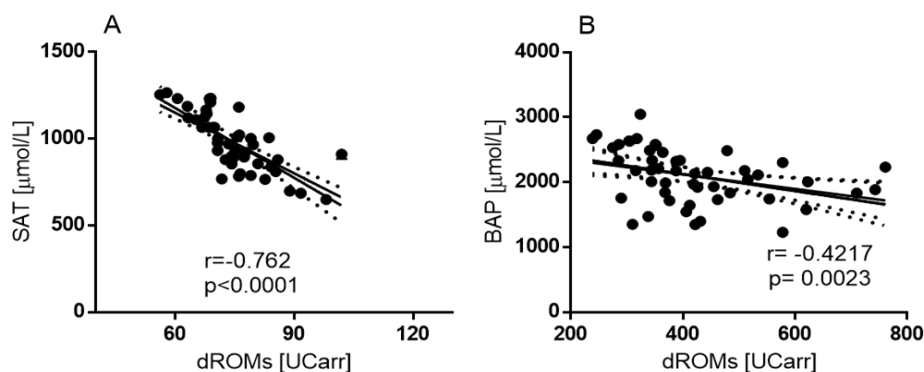
Обсъждане на резултатите

Слюнката се явява първа линия на защитата срещу ОС. В настоящето проучване се установяват статистически значимо по-високи стойности на ROS в пациентската група с активна форма на ХВЧЗ спрямо пациентите с лека форма или ремисия, както и спрямо контролната група. Интересно е да се отбележи, че 75% от тях имат стойности, попадащи извън определените от нас референтни граници. Прави впечатление, че нивата на ROS във втората пациентска група, вероятно поради стихване на хроничното възпаление, не се различават значимо от тези на контролните индивиди. Резултатите за АОС, обратно, показват ниски стойности, като най-изявено понижение се наблюдава при пациентите с активна форма на ХВЧЗ. Те се различават статистически значимо както спрямо контролната група ($p < 0.0001$), така също и спрямо пациентите от групата с лека форма или ремисия ($p < 0.0001$), но отново различие между последната група и контролните индивиди не се наблюдава. В потвърждение на резултатите от настоящето проучване са и други данни от литературата, отбелязващи повишение на слюнчените нива на ROS и намаление на АОС независимо от използваните различни тестове за установяването на оксидативния стрес (Jahanshahi et al., 2004; Abbas and Zaidan, 2017; Finamore et al., 2020). Като се има предвид, че средните стойности и на двата слюнчени показателя са извън референтния диапазон за пациентите с активност/тежка форма на заболяването, отличаващи се значимо от пациентите в лека форма или ремисия, както и от контролите, дава основание слюнчените ROS и АОС да бъдат предложени като полезни неинвазивни маркери за проследяване активността на процеса при ХВЧЗ.

Подобно на слюнчените, серумните нива на ROS са значимо по-високи при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение с тези с лека форма или в ремисия ($p = 0.012$), както и спрямо контролната група ($p < 0.0001$), но между последните две групи значимо различие не се установява ($p > 0.999$). По отношение на АОС в серум също се наблюдават ниски нива в пациентските групи, отличаващи се значимо от тези в контролната група ($p < 0.0001$). Интересно е, че между двете пациентски групи липсва статистически значимо различие ($p = 0.695$). Може да се заключи, че хронифицирането на възпалителния процес води до трайно намаляване на АОС. Средната стойност на серумните нива на ROS при пациентите с активност на заболяването попада в горно-граничния диапазон на определения от нас референтен интервал, като 33% от стойностите са извън него. Антиоксидантният капацитет в тази група е силно занижен и средната му стойност е под долна референтна граница. Ballini и сътр. (2019), използващи същите като нашите тестове, наблюдават повишени стойности на ROS (436 ± 25 UCarr) и намаление на АОС (1775 ± 125 $\mu\text{mol/L}$) в серума на пациенти с ХВЧЗ,

които се нормализират след прилагане на пробиотици, водещо до подобряване на клинична симптоматика. В друго изследване също се изтъква ролята на дисбиозата и недостатъчността на антиоксидантните защитни механизми, които стимулират провъзпалителни реакции и задълбочават чревните увреди (Dudzińska et al., 2018; Yuksel et al., 2017). Интересно е, да се отбележи, че в проучването на Koutroubakis и сътр. (2004) липсват статистически значими различия в АОС между пациентите с УК с активност на заболяването в сравнение с тези с неактивно заболяване, докато пациентите с активна форма на БК имат значително по-ниски средни стойности на АОС в сравнение с тези с неактивна форма. Считаме че тези резултати напълно съответстват на нашите, тъй като в нашата пациентска група превалират пациентите с УК (n=40).

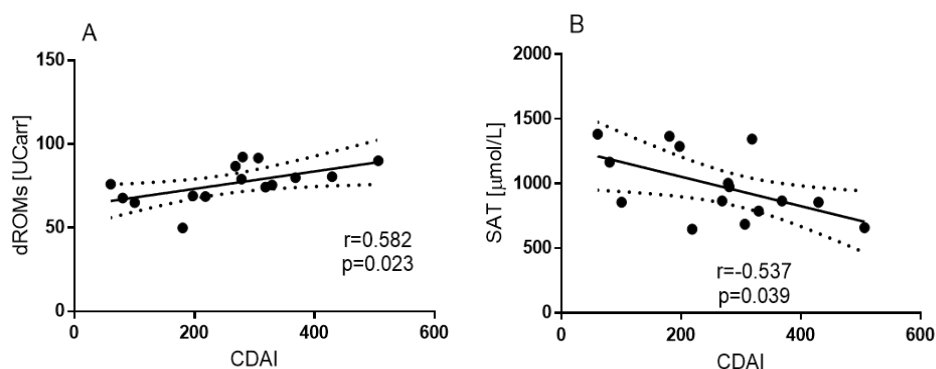
Оксидативният стрес може да бъде един от основните фактори за тъканното увреждане и фиброза, които характеризират БК (Alzoughaibi, 2013). Ху Х. и сътр. (2017) описват патогенетичен механизъм, при който NF-κB възпалителен път, както и отлагането на окислени протеини в мукозата способстват епително-мезенхимния преход, стоящ в основата на фиброзния процес при пациенти с БК. От друга страна добре известен е фактът, че антиоксидантите инхибират производството на възпалителни цитокини (Maor et al., 2008). Така установеният намален АОС при тези пациенти не може да се противопостави достатъчно ефективно на фиброзния процес. Взаимовръзката между нивата на ROS и АОС, измерени в слюнка и серум при пациентите с ХВЧЗ са представени на фигура 25 А, В. Наблюдава се обратна и значима корелационна зависимост между тези показатели и в двата биологични материала, като в слюнката взаимовръзката е висока по сила, а в серума – умерена. По-изявената корелационна зависимост между степента на генериране на ROS и бързото изчерпване на АОС в слюнката в сравнение със серума, вероятно се дължи на по-ограничения набор от антиоксидантни системи в слюнката с основен представител UA.



Фигура 25. Корелационна зависимост между нивата на генерираните ROS и нивата на АОС в слюнка (А) и серум (В) при пациенти с ХВЧЗ

*Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (*dROMS – тест за определяне на ROS; **SAT и BAP – тестове за определяне на АОС)*

Чрез изследване на корелационните зависимости между степента на активност на изследваните две основни форми на ХВЧЗ (БК и УК) с показателя за генериране на ROS и нивата на АОС може косвено да се докаже ролята на ОС за хода на заболяването и тежестта на възпалението. На фигури 26, 27, 28 и 29 са показани тези корелационни зависимости, като активността на заболяването при пациенти с БК се изразява посредством CDAI, а при пациентите с УК – Mayo индекса.

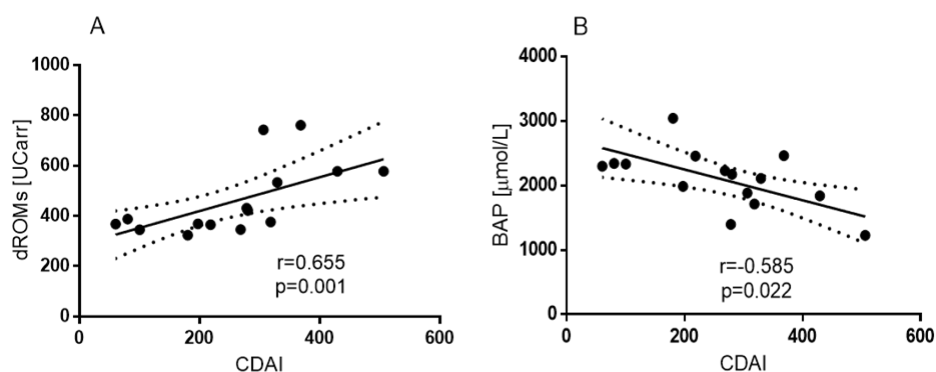


Фигура 26. Корелационна зависимост между CDAI и слюнчени нива на ROS (А) и АОС (В) при пациенти с БК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент.

(CDAI – индекс за активност при БК, dROMS – тест за определяне на ROS;

SAT – тест за определяне на АОС)

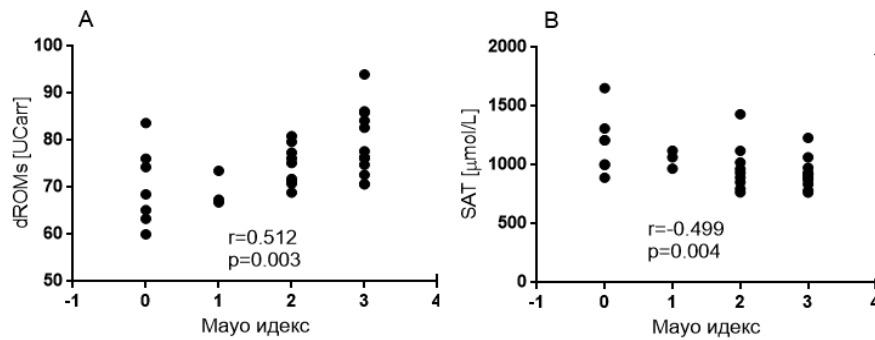


Фигура 27. Корелационна зависимост между CDAI и серумни нива на ROS (А) и АОС (В) при пациенти с БК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент.

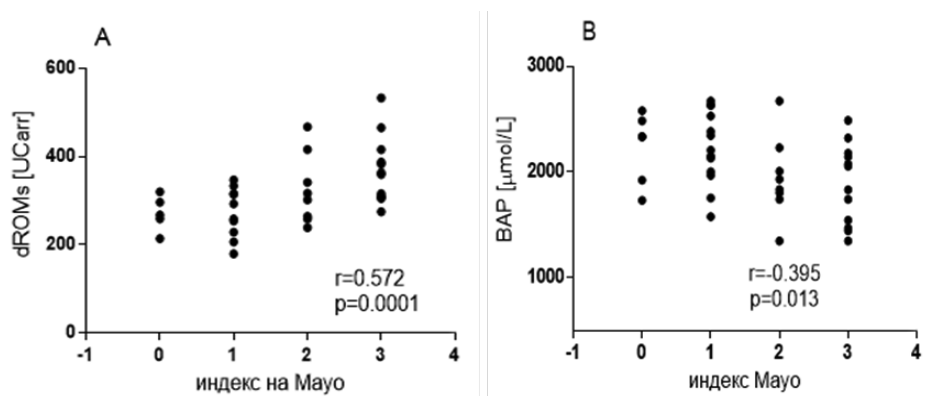
(CDAI – индекс за активност при БК, dROMS – тест за определяне на ROS;

BAP – тест за определяне на АОС)



Фигура 28. Корелационна зависимост между Mayo индекс и слюнчени нива на ROS (А) и АОС (В) при пациенти с УК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (Mayo индекс – индекс за активност на УК; dROMS – тест за определяне на ROS; SAT – тест за определяне на АОС)



Фигура 29. Корелационна зависимост между Mayo индекс и серумни нива на ROS (А) и АОС (В) при пациенти с УК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (Mayo индекс – индекс за активност на УК; dROMS – тест за определяне на ROS; BAP – тест за определяне на АОС)

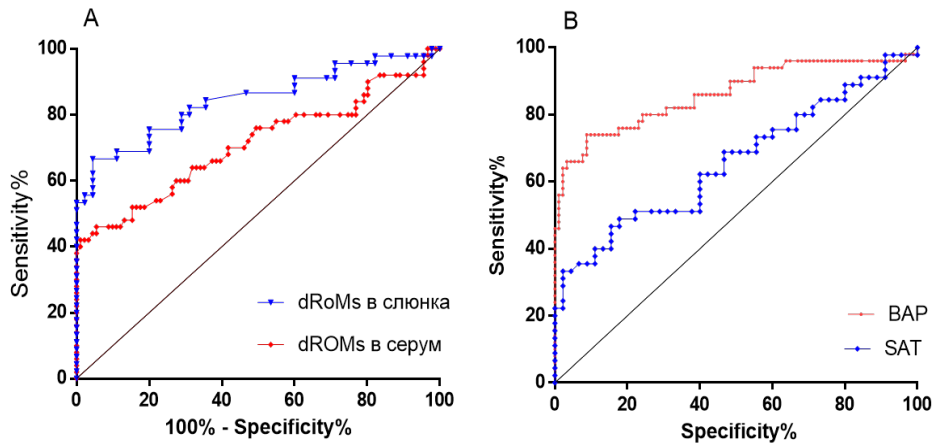
На посочените фигури ясно се вижда значителната позитивната корелационна зависимост между генерираните ROS и индексите на активност и при двете заболявания, както в слюнка, така и в серум. Напълно логична е наблюдаваната отрицателна корелационна зависимост между АОС и индексите на активност на ХВЧЗ и за двата биологични материала, като зависимостта е значителна по степен с изключение на тази в серум при УК, която е умерена. Наблюдаваните статистически значими корелационни зависимости се явяват като аргумент за патогенетичната роля на ROS при развитието и тежестта на възпалителния процес при ХВЧЗ. Прави впечатление по-силно изявената по степен корелационна връзка в слюнка между активността на заболяването и АОС в сравнение със серума при най-многобройната част от изследваната пациентска група, а именно при пациентите с УК, и почти сравними корелационни зависимости при тези с БК.

В литературата има натрупани не малко данни за възникването на ОС в серум и неговото задълбочаване с хронифициране при ХВЧЗ. В редица проучвания, както и в последващ метаанализ (Yuksel et al., 2017; Luceri et al., 2019; Krzystek-Korpacka et al., 2020) се подчертават статистически значимо по-високи нива на ROS при изследваните пациенти в сравнение с контролите и въпреки разнопосочните и различни по сила корелационни зависимости между показателите на ОС и активността на заболяването се заключава, че ОС стои в основата на патогенетичните механизми на ХВЧЗ.

За разлика от серума, слюнката е слабо изследвана при пациенти с ХВЧЗ, особено относно корелационните взаимовръзки между активността на заболяването и показателите на ОС. Данните от настоящето проучване се подкрепят от резултатите на Szczeklik и сътр. (2018), които установяват нарастващи стойности на малондиалдеhid (MDA) в слюнка при пациенти с БК в зависимост от тежестта на заболяването (положителна корелация с CDAI). Този показател, отразяващ липидната пероксидация, се обвързва положително и с CRP, а отрицателно с показатели на антиоксидантната защита на слюнката (FRAP, GSH и CAT).

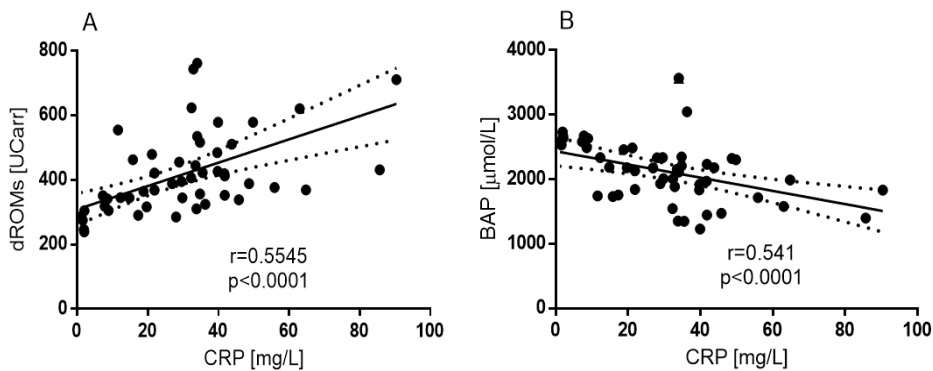
Резултатите, както от литературата, така и от настоящото проучване, показват, че ОС, възникващ вследствие на дисбаланса между прооксиданти и антиоксиданти играе съществена роля не само при иницирането, но и в поддържането на възпалителния процес при ХВЧЗ.

На фигура 30 А и В е посочен диагностичният потенциал на изследваните слюнчени и серумни показатели за генериране на ROS и AOC, оценени с помощта на ROC анализ. Площта под ROC кривата за d-ROMs е по-висока за слюнка (AUC=0.844, $p<0.0001$) в сравнение с тази за серум (AUC=0.710, $p=0.0002$). Обратно площта под ROC кривата за AOC е по-висока за серум (AUC=0.854, $p<0.0001$) в сравнение с тази за слюнка (AUC=0.660; $p=0.009$). В литературата се откриват данни за диагностичния потенциал на показателите за ОС единствено в серум. Така напр. Luceri и сътр. (2019) изследват серум на пациенти с БК и получават резултат относно диагностичната надеждност на използвания от тях тест за генериране на ROS сравними с нашия, но относно AOC получават твърде ниска диагностична надеждност. Доколкото ни е известно, единични са данните за показатели, оценяващи ОС в слюнка при ХВЧЗ. От нашите резултати е видно, че слюнчените ROS отразяват в по-добра степен патологичния чревен процес в сравнение с ROS в серум, но слюнченият AOC не е особено информативен, вероятно поради по-ограничения антиоксидантен състав на слюнката с основен представител UA.



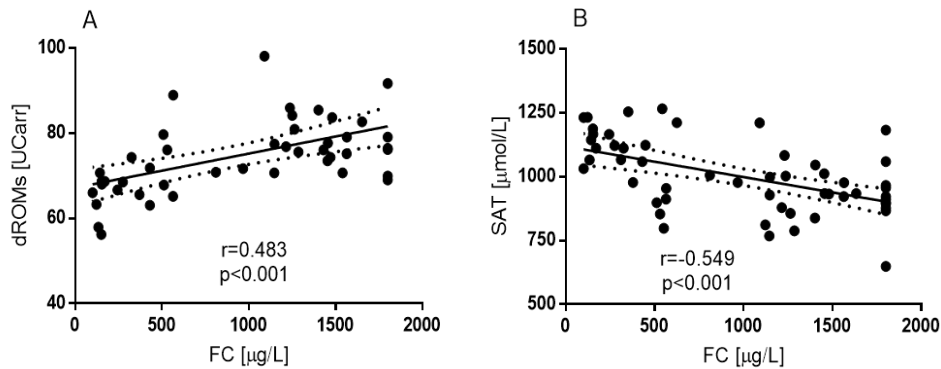
Фигура 30. ROC криви, отразяващи диагностичния потенциал на ROS (А) и АОС (В) в слюнка и серум при пациентите с ХВЧЗ.
(dROMS – тест за определяне на ROS; SAT и BAP – тестове за определяне на АОС)

Сред множеството лабораторни показатели, използвани в лечебно-диагностичния процес при ХВЧЗ, рутинно се използва С-реактивния протеин (CRP) като маркер за системно възпаление. В последното десетилетие се наложи и фекалният калпротектин (FC) като маркер за оценка на локалното чревно възпаление. За оценка на взаимовръзката между хроничното чревно възпаление и оксидативния стрес се осъществи корелационен анализ между серумните и слюнчени нива на ROS и АОС спрямо рутинните лабораторни инфламаторни маркери CRP и FC. Графичното изображение на тези корелационни взаимоотношения са показани на фигури 31 и 32.



Фигура 31. Корелационна зависимост на CRP със серумни нива на ROS (А) и АОС (В) при пациентите с ХВЧЗ

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (dROMS – тест за определяне на ROS; BAP – тест за определяне на АОС)



Фигура 32. Корелационна зависимост между FC със слюнчени нива на ROS(A) и АОС (B) при пациентите с ХВЧЗ

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (dROMS – тест за определяне на ROS; SAT – тест за определяне на АОС)

Резултатите от проведения корелационен анализ показват статистически значими положителна корелационна взаимовръзка между CRP със серумните нива на ROS и отрицателна корелационна взаимовръзка между CRP и серумния АОС, като и двете зависимости са значителни по сила (фиг. 31). Подобни резултати се откриват и в проучването на Yuksel и сътр. (2017), които установяват умерена отрицателна корелация между нива на CRP и TAC и положителна умерена корелация между CRP и TOS. Проведеният корелационен анализ между маркера, сочещ локалното чревно възпаление (FC) и показателите за ОС в слюнка също доказва статистически значими положителна умерена корелационна взаимовръзка между FC и слюнчени нива на ROS и отрицателна значителни по сила корелационна взаимовръзка между FC и слюнчения АОС (фиг. 32). CRP в серум, както и FC са важни показатели за оценка на болестната активност и риска от рецидив при ХВЧЗ. Каскадата от инфламаторни реакции, активацията на неутрофили и моноцити в мукозата, съпътствани с проинфламаторни цитокини обуславят и генерирането на ROS. Горепосочените значителни корелационни зависимости между CRP, FC и изследваните ROS и АОС са поредното доказателство, че в основата на патогенетичните механизми на хроничния възпалителен процес в червата стои оксидативния стрес.

7. Значение, корелационни взаимовръзки с активността на заболяването и диагностичен потенциал на нови биомаркери: фекален калпротектин и серумна аденозиндезаминаза за диагностиката и мониториране на пациенти с ХВЧЗ и сравнение с утвърдените маркери на възпаление

Резултати и обсъждане

Една от основните характеристики на клиничния ход на ХВЧЗ е непрекъснатото редуване на периоди с обостряне и ремисия. Определянето

степената на чревно възпаление играе значителна роля за оценка на тежестта на заболяването, а така също и за терапевтичното му управление. Рутинно измерваните възпалителни маркери, като CRP, СУЕ, WBC и фекален калпротектин (FC) са признати за важни индикатори, както за първоначална диагностика, така и за мониториране на активността на ХВЧЗ (Spiceland and Lodhia, 2018).

CRP е добре познат и рутинно използван като изключително чувствителен и обективен неспецифичен маркер за остро възпаление. Той може да бъде с ниски стойности при ХВЧЗ, въпреки активното възпаление на чревната лигавица. В допълнение е установена значителна хетерогенност в CRP отговора между двата основни представителя на ХВЧЗ – УК (възпалението е ограничено до мукозата) и БК (възпалението е трансмурално). Така CRP се явява по-надежден маркер в случаите на БК, както и сравнително по-ненадежден при пациентите УК.

СУЕ също се явява неспецифичен индикатор за възпаление. Като нединамичен показател, той не е особено подходящ за проследяване клиничния ход и отговора към терапията при пациентите с ХВЧЗ. Освен това е установено, че СУЕ корелира по-добре с активността при локализация на възпалението в дебелото черво и в много по-малка степен при ангажиране само на тънките черва (Vermeire et al., 2006). Макар че нивата на СУЕ и CRP не винаги добре отразяват ендоскопските промени в червата, резултатите от настоящото проучване с наличното статистически значимо различие между двете пациентски групи и за двата показателя, потвърждават ползването им при мониторирането на клиничния ход на заболяването (табл. 39).

Калпротектинът (CP) е цитоплазмен протеин, секретирани чрез дегранулация на неутрофилните левкоцити и моноцити локално, в мястото на възпаление. Въпреки че той може да бъде открит и измерен в няколко биологични матрици (плазма, урина, слюнка, синовиална течност), най-разпространено е определянето му във фекална маса. В последното десетилетие за мониториране на ХВЧЗ в лабораторната практика се наложи параметърът FC, определен в биологична проба (фецес), взета по неинвазивен начин. Като маркер, отразяващ директно локалния възпалителен и хеморагичен процес в чревната лигавица, той се характеризира с висока диагностична чувствителност и специфичност. След провеждане на редица мета-анализи се приема, че стойности на $FC=50\div 100\ \mu\text{g/g}$ фекална маса могат да се определят като cut-off стойности за разграничаване на функционалните чревни нарушения от реално чревно възпаление, налагащо последваща диагностична ендоскопия (Van Rheenen et al., 2010; Holtman et al., 2016). Съществуват разнообразие от методи за количествено определяне на FC. За целите на настоящото проучване са използвани два търговски теста на

BÜHLMANN, Switzerland. Единият, Quantum Blue®fCAL, с обхват 30÷300 µg/g е предназначен за скриниране на суспектни за ХВЧЗ пациенти и е използван за определяне на FC само в контролната група. Средната стойност на FC за контролната група попада под чувствителността на теста (<30 µg/g фекална маса). Другият тест, Quantum Blue®fCAL High Range, е с обхват 100÷1800 µg/g фекална маса и е използван за количествено определяне на FC в пациентските групи.

Резултатите от изследваните рутинни възпалителни маркери в трите проучвани групи са представени в таблица 37.

Всички тествани параметри са статистически значимо увеличени в групата на пациенти с активна форма на ХВЧЗ в сравнение както с пациентите с лека форма или ремисия така и с индивидите от контролната група. Статистически значимо различие между пациентите от втората подгрупа с контролната се установяват само за WBC и FC. Понеже средната стойност на WBC за тази пациентска група попада в референтните граници и не е добър дискриминатор, може със сигурност да се потвърди, че FC като локален маркер за възпаление е най-подходящият маркер за мониториране активността на ХВЧЗ.

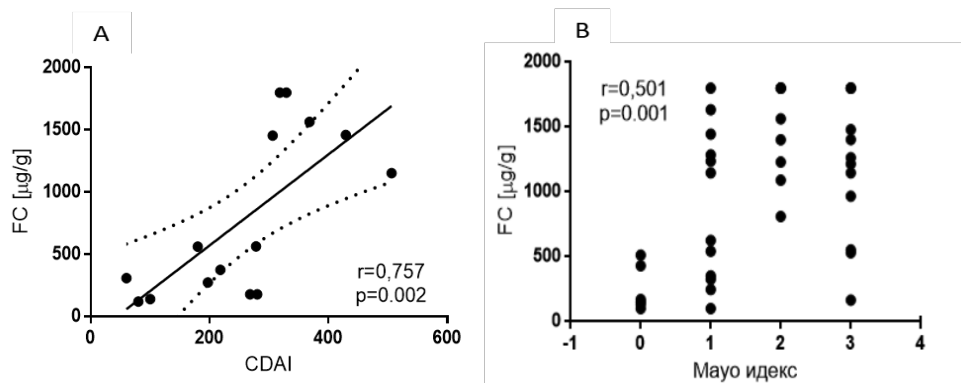
Таблица 37. Рутинни възпалителни маркери, изследвани в трите групи

Параметър (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
WBC (x10⁹/L) (3.5-10.5 x 10 ⁹ /L)	10.8±3.6	8.6±2.8	6.49±1.1	p*=0.030 p**<0.0001 p***=0.018
СУЕ (mm/h) (до 20 mm/h)	36.8±16.7	25.7±12.2	14.98±3.2	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=ns
CRP (mg/L) (до 5 mg/L)	30.9±25.2	10.3±7.5	2.38±1.6	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=ns
FC (µg/g) (<50 µg/g)	1403.1±452.9	293.8±162.1	<30.0	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=0.0005

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni (p – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)*

За да определим клиничната значимост на FC при пациентите с ХВЧЗ, потърсихме асоциации между FC и изчислените индекси на клиничната активност на заболяванията които са представени на фигура 33А, В. Статистически значима (p=0.0016) и висока по степен корелационна връзка (Spearman r=0.757) се

установява между нивата на FC и индекса на активност при пациентите с БК (CDAI). При пациентите с УК също се установява статистически значима ($p=0.0012$) и значителна по степен корелация (Spearman $r=0.501$) с Mayo индекс.



Фигура 33. Корелационна зависимост между клиничната активност при ХВЧЗ и FC при: А) пациенти с БК (CDAI) и В) пациенти с УК (Mayo индекс)
Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

Традиционно използваните индекси CDAI при БК и Mayo индекса при УК за количествена оценка на клиничната активност и терапевтичния ефект при ХВЧЗ, се основават предимно на субективната оценка на пациентите за тежестта на симптомите. Така често тези клинични индекси не корелират особено добре с възпалението или заздравяване на лигавицата, оценени посредством ендоскопско и хистологично изследване (Lamb and Mansfield, 2010). Базирайки се на тези индекси е установено, че много пациенти в клинична ремисия все още имат субклиничен мукозит. Многобройни проучвания и мета-анализи през последното десетилетие доказват, че калпротектинът като локален и неинвазивен възпалителен маркер корелира по-добре с ендоскопската и хистологичната находка и така предоставя по-точна информация относно активността при ХВЧЗ. (Sirponen et al., 2010; Schoepfer et al., 2012). Оформя се съгласувано експертно мнение относно предиктивните позитивни и негативни стойности на FC като диагностично средство при ХВЧЗ, според което FC над 250 µg/g идентифицира пациенти, за които е почти сигурно, че имат чревно възпаление и е необходимо да се подложат на ендоскопско изследване; при стойности на FC 100-250 µg/g пациентите би трябвало да се изследват отново в рамките на следващите 3 месеца, а стойност на FC под 100 µg/g имат много висока негативна предиктивна стойност за ХВЧЗ, като го утвърждават като полезно скриниращо средство, с което има възможност да се намали броят на ненужните и тежки за пациентите инвазивни ендоскопски изследвания (Reenaers et al., 2018).

Осъществен е корелационен анализ на зависимостта между активността/тежестта на заболяването, оценена чрез позитивната предиктивна стойността на FC=250 µg/g фекална маса в общата пациентска група (УК+БК) и

използваните рутинни възпалителни маркери. Логично е да се получи висока и статистически значима корелационна зависимост с FC (Spearman $r=0.825$, $p<0.0001$). Рутинните възпалителни маркери се подреждат в низходящ ред според изчисления корелационен коефициент както следва: CRP със Spearman $r=0.449$ и $p<0.001$; СУЕ със Spearman $r=0.374$ и $p=0.005$; WBC – Spearman $r=0.184$ и $p=ns$. Така сред съпоставените възпалителни маркери CRP се оказва като най-добър показател след FC, СУЕ е умерено информативен, докато WBC не е информативен по отношение активността/тежестта на заболяването. В мета-анализа на Chang и сътр. (2015) се предоставят данни, сходни с нашите резултати и потвърждават предимството на локалния маркер за чревно възпаление пред останалите възпалителни маркери.

FC често се явява като предиктор за поява на усложнения, особено при пациенти с по-голяма давност на заболяването (Tham et al., 2018). Множество ретроспективни проучвания обосновават използването му и при мониториране на пациенти след чревна резекция по повод усложнение на заболяването. Резултатите от нашето проучване също потвърждават ролята на FC като предиктор на усложненията. Пациентите с активност на заболяването са разделени на две подгрупи: в едната са включени 18 пациента (50.0%) с регистрирано поне едно усложнение (най-често абсцес, фистула или полипоза), налагащо оперативна намеса. Давността на заболяването при тези пациенти е повече от пет години и най-често са имали поне един релапс годишно. Другата подгрупа обхваща останалите пациенти с активност на заболяването, но без регистрирани усложнения (18 индивида – 50%). В първата подгрупа средната стойност на FC е 1540 ± 297 $\mu\text{g/g}$, която се различава статистически значимо ($p=0.029$) от тази във втората подгрупа (1255 ± 464 $\mu\text{g/g}$).

Аденозиндезаминаза като нов биомаркер при проследяване на пациенти с ХВЧЗ.

Основна характеристика при хроничните чревни заболявания е засилената миграция и задържане на ефекторни макрофаги, неутрофили и Т-лимфоцити във възпалените участъци на червата, където те активират и освобождават възпалителни цитокини. Това води до локално увеличение на IL-12, IL-17, TNF-алфа и IFN-гама, участващи в хроничното чревно възпаление при пациенти с БК, докато при пациенти с УК е установено значително увеличение на IL-13 (Th-2), играещо роля в поддържане на хроничното възпаление чрез хиперплазия на бокалните клетки и хиперсекреция на слюз (Takiishi, et al., 2017; Kim and Cheon, 2017).

ADA е важен ензим на вътре- и извънклетъчния метаболизъм на пуриновите нуклеотиди. Доказано е, че повлиява клетъчната имунна активност и участва в патогенетичните механизми при различни хронични възпалителни заболявания (туберкулоза, белодробни, автоимунни и невродегенеративни заболявания, сепсис, ХИВ и др.). Ролята на ADA в патофизиологията на ХВЧЗ е все още ненапълно изяснена. Счита се, че пролиферацията и диференциацията на лимфоцитите, моноцито-макрофагеалната система и цитокиновата възпалителна каскада с активиране на Т-клетъчния отговор са отговорни за промените в активността на ADA (Kim and Cheon, 2017). Ензимът АДА се открива не само в цитозола, но и по плазмената мембрана на много видове клетки. Благодарение на ензимната си активност и експресията си върху Т-лимфоцитите и дендритните клетки, ектоензимът регулира локалната извънклетъчна концентрация на аденозин и представлява критичен регулатор на нивата на ендогенния аденозин на мястото на възпалението. Немалко изследвания подкрепят участието на аденозиновите пътища в намаляването на аномалните възпалителни реакции. Извънклетъчният аденозин играе двойка роля: от една страна, той е алармен сигнал за увреждане на тъканите, а от друга, той играе защитна роля (Antonioli et al., 2008). Чрез рецепторен механизъм аденозинът модулира ентералните имунни и възпалителни реакции, като упражнява противовъзпалително действие. Предполага се, че аденозинът е модулатор на двигателната и секреторна активност на червата и регулира/променя предаването на болката. Повишените нива на извънклетъчен аденозин, чрез активиране А2А рецептор върху Т-лимфоцитите, може селективно да потискат експресията на провъзпалителни цитокини, отговорни за хроничното възпаление. За разлика от това, активирането на А2В рецепторите върху чревните епителни клетки обратно, води до провъзпалителен ефект, засилено производство на IL-6 и активиране на неутрофилите (Antonioli et al., 2012; 2019).

Резултати и обсъждане

ADA е недостатъчно познат и малко изследван показател като маркер на клетъчно-медиацията имунен отговор, отразяващ активацията на левкоцитите при хронично чревно възпаление. Установени са повишени серумни нива на ADA при пациенти с активна форма на БК, като нивата им намаляват и могат да достигнат нормални граници в периодите на ремисия (Fengming and Jianbing, 2014; Beyazit et al., 2012; Sharan and Rajesh 2014). По тези причини АДА привлича вниманието ни като обещаващ нов биомаркер, който би могъл да бъде полезен при мониторирането на пациенти с ХВЧЗ. Резултатите от настоящото проучване относно серумните нива на ензима в трите изследвани групи са представени в таблица 38.

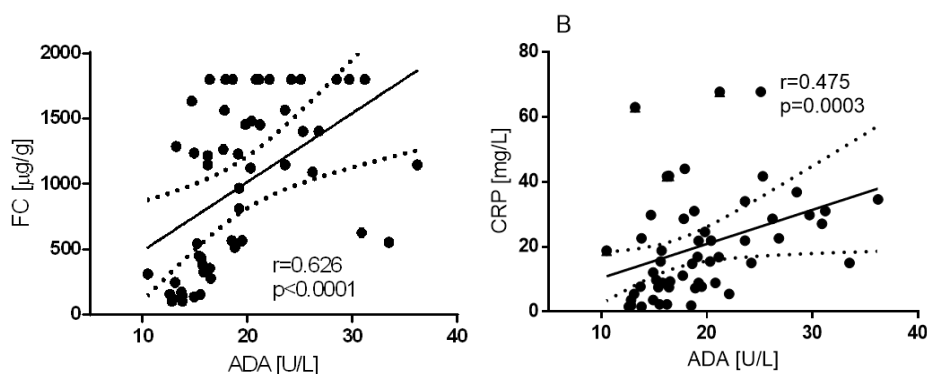
Таблица 38. Серумни нива на ADA в трите изследвани групи

Параметър (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
ADA (U/L) (до 18 U/L)	21.6±5.6	14.6±1.3	9.5±3.0	p* < 0.0001 p** < 0.0001 p*** = 0.0005

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni (p* – сравнение между пациенти в активна форма на заболяването и пациенти в лека форма или ремисия; p** – сравнение между пациенти в активна форма и контролната група; p*** – сравнение между пациенти в лека форма/ремисия и контролната група)

Резултатите ясно показват, че серумните концентрации на ADA са статистически значимо по-високи при пациентите с умерена и тежка форма на заболяването в сравнение с тези с лека форма или в ремисия, както и с контролната група. Установява се и статистически значимо различие между групата пациенти с лека форма или ремисия спрямо контролните индивиди. Тези резултати са в съгласие с малко публикуваните до момента данни и подкрепят идеята, че ензимът ADA е многообещаващ серумен биомаркер, който би могъл да се използва при мониториране на ХВЧЗ.

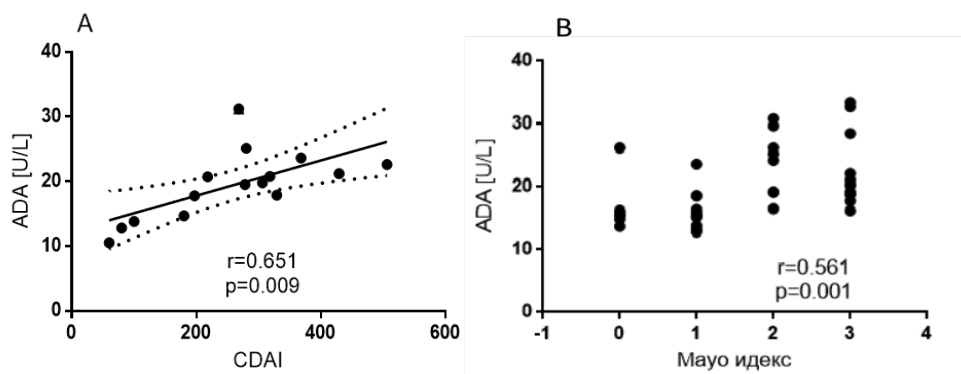
Корелационният анализ между нивата на ADA и рутинните лабораторни маркери за възпаление (фигура 34) показва значителна положителна корелация с FC (Spearman $r=0.626$; $p<0.0001$) и умерена положителна корелация (Spearman $r=0.475$; $p<0,001$) със CRP (фиг. 50). Такава корелационна връзка липсва между ADA и CUE (Spearman $r=0.16$; $p=ns$), както и с WBC (Spearman $r=0.11$, $p=ns$).



Фигура 34. Корелационна зависимост между активността на ADA с FC (А) и CRP (В) при пациенти с ХВЧЗ

Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

За да определим клиничната значимост на ADA при пациентите с ХВЧЗ, потърсихме асоциации между ензима и изчислените индекси на клиничната активност на заболяванията, които са представени на фигура 35 А, В. Статистически значима ($p=0.009$) и значителна по степен корелационна връзка (Spearman $r=0.651$) се установява между нивата на ADA и индекса на активност при пациентите с БК (CDAI). При пациентите с УК също се установява статистически значима ($p=0.001$) и значителна по степен корелация (Spearman $r=0.561$) с Mayo индекс.



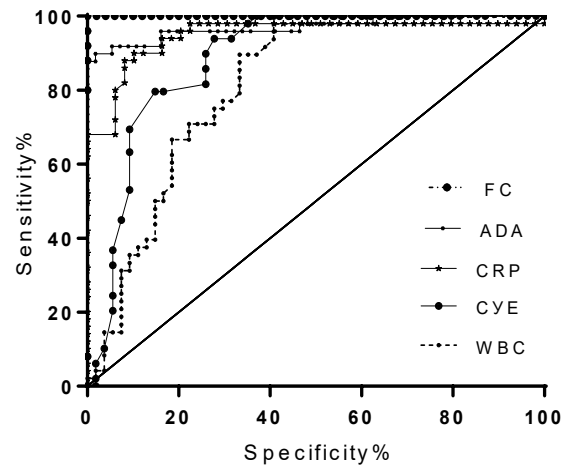
Фигура 35. Корелационна зависимост между клиничната активност при ХВЧЗ и ADA при: А) пациенти с БК (CDAI) и В) пациенти с УК (Mayo индекс)
 Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

Диагностичната надеждност както на рутинните възпалителни маркери, така и на новия маркер АДА е оценена посредством ROC анализ, като са съпоставени резултатите от всички пациенти с ХВЧЗ с тези на контролната група. Площите под ROC кривите са представени на таблица 39 и графично онагледени на фигура 36.

Таблица 39. Диагностичен потенциал на възпалителните маркери при пациентите с ХВЧЗ

Параметър	*AUC	**95% CI	p value
FC	0.999	0.988 до 1.00	<0.0001
ADA	0.973	0.943 до 1.00	<0.0001
CRP	0.954	0.913 до 0.995	<0.0001
СУЕ	0.895	0.829 до 0.960	<0.0001
WBC	0.811	0.725 до 0.898	<0.0001

(*AUC – площ под кривата; **CI – доверителен интервал)



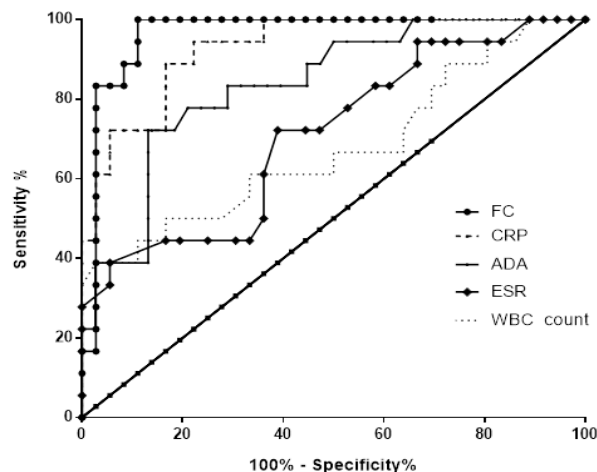
Фигура 36. ROC криви на възпалителните маркери при пациентите с ХВЧЗ.
(ROC – Receiver operating characteristic curve)

Прави впечатление, че площта под ROC кривата на FC, като параметър, отразяващ директно локалните възпалителни промени в чревната лигавица, е близка до единицата. Така, неслучайно, FC се характеризира с изключително висока диагностична чувствителност и специфичност. От всички останали изследвани показатели най-голяма площ под кривата се получава за ензима АДА, доближаваща се почти до тази на FC, с което се доказва високият диагностичен потенциал на този нов серумен биомаркер. ROC анализът показва много добър диагностичен потенциал и за CRP и по-слаб за CUE и WBC. В допълнение е проведен ROC анализ на посочените параметри по отношение възможността им да дискриминират пациенти с ХВЧЗ с различна активност/тежест на заболяването, като се съпоставят резултатите от изследванията на пациентите с активна форма на заболяването спрямо тези с лека форма или ремисия. Резултатите от този анализ са посочени в таблица 40 и онагледени на фигура 37.

Таблица 40. Потенциал на изследваните възпалителни маркери за дискриминиране на пациентите с различна активност/тежест на ХВЧЗ.

Параметър	*AUC	**95% CI	p value
FC	0.965	0.915 до 1.014	<0.0001
CRP	0.929	0.864 до 0.994	<0.0001
ADA	0.837	0.728 до 0.946	<0.0001
CUE	0.709	0.561 до 0.858	0.013
WBC	0.677	0.513 до 0.841	0.036

(*AUC – площ под кривата; **CI – доверителен интервал)



Фигура 37. ROC криви относно потенциала на изследваните възпалителни маркери за дискриминиране на пациентите с различна активност/тежест на ХВЧЗ.
(ROC – Receiver operating characteristic curve)

Не е изненадващо, че площта под ROC кривата на FC е близка до единицата, убедително доказателство за изключително високата му диагностична чувствителност и специфичност. Относно дискриминирането на пациентите с различна активност/тежест на ХВЧЗ ADA отстъпва на рутинния възпалителен маркер CRP, чиято площ под кривата е най-голяма измежду всички изследвани серумни показатели. Въпреки това ADA показва добра диагностична надеждност, нареждайки се според площта на кривата директно след CRP. И при този анализ се установява по-слаб диагностичен потенциал за СУЕ и WBC.

V. ИЗВОДИ

1. Доказаната висока аналитична надеждност на оптимизираните и валидирани методи за количествено определяне на sIgA, ROS, AOC и нитрити в слюнка предопределя възможността да бъдат използвани в клинично-лабораторната практика.
2. При проучване на биологичната вариация на избрани слюнчени биохимични параметри, показатели на ОС и клетъчни елементи не се установява влияние на факторите пол и възраст, докато тютюнопушенето води до значителни промени в концентрацията им.
3. Определените референтни граници (РГ) на изследваните параметри в слюнка за представителна извадка от българската популация отразяват специфичните национални особености на бит и култура. Те са сравними с публикувани РГ от изследвания, проведени с нестимулирана слюнка и използващи идентични аналитични методи.
4. Слюнката не представлява обикновен ултрафилтрат на серума, доказано с липсата на значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум, както при здрави лица, така и при пациенти с хронични заболявания на ГИТ.
5. Хроничният възпалителен процес при най-честите заболявания на ГИТ оказва статистически значими промени в биохимичния и клетъчен състав на нестимулирана слюнка.
6. От всички изследвани биохимични показатели в слюнка с най-добър диагностичен потенциал за хроничните гастрити са LDH, албумин и нитрити, а за ХВЧЗ – LDH, sIgA и sAA.
7. По отношение мониториране хода на заболяването посочените слюнчени параметри показват по-добра възможност за разграничаване фазите на активност на заболяването в сравнение със съответните серумни показатели.
8. Установените статистически значими различия в броя на слюнчените левкоцити и епителни клетки в хода на възпалителния процес и попадащи извън РГ е основание тези параметри да се предложат като допълнителни при мониториране активността на заболяванията на ГИТ.
9. Значимо увеличените нива на ROS и изчерпания AOC при изследваните хронични заболявания на ГИТ, установените значими корелационни зависимости между тези параметри и индексите на активност на ХВЧЗ, както и с ендоскопската находка при хроничния гастрит потвърждават тяхната патогенетична роля за възпалителния процес и обуславят възможността да бъдат проследявани в хода на патологичния процес.

10. По-значимите промени на параметрите на ОС в слюнката в сравнение със серума доказват потенциала ѝ като подходящ биологичен материал за проследяване на пациентите и евентуалното намаляване броя на неприемливите за пациента ендоскопски изследвания.
11. Установена е изключително висока диагностична надеждност на FC и възможността му да разграничава пациентите с различна степен на активност/тежест на заболяването, както и да предсказва появата на усложнения в бъдеще.
12. Доказана е ролята на серумния ензим ADA в имуно-медиацията възпалителен процес при ХВЧЗ и е установен по-добър диагностичен потенциал в сравнение с повечето рутинно използвани серумни параметри, доближаващ се до този на FC.
13. Значимото нарастване на серумните нива на ADA във фазите на активация дава основание и този параметър да се предложи като нов и удачен допълнителен биомаркер в панела от рутинни изследвания на пациентите с ХВЧЗ.

VI. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

1. Оптимизирани и валидирани са нерутинни методи за количествено определяне на показателите на ОС (ROS И АОС), нитрити и sIgA в слюнка, даващо възможност да се използват в бъдещи научни изследвания.
2. Проведено е уникално до момента изследване на множество биохимични показатели, клетъчни елементи и показатели на ОС в нестимулирана слюнка с определяне на биологичната им вариация в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене при репрезентативна група от здрави лица с български произход.
3. Определени са референтните граници на изследваните параметри в слюнка при репрезентативна група от българската популация, даващо възможност за по-добра интерпретация на резултатите.
4. Хвърлена е светлина върху особеностите и значението на слюнката като допълнителен биологичен материал като се доказва, че тя не е пасивен ултрафилтрат на серума и съставът ѝ е в тясна взаимовръзка с физиологични и патологични състояния на индивида.
5. За първи път в България се изследват показатели на ОС в слюнка и серум при хронични заболявания на ГИТ и е доказана е ролята им в патогенезата на хроничния възпалителен процес.
6. Доказаният по-добър потенциал на някои от слюнчените биохимични параметри и показатели на ОС за разграничаване фазите на активност в сравнение със съответните серумни показатели обосновава възможността те да се използват успешно при мониториране хода на хроничните заболявания на ГИТ.
7. За пръв път в България бе проучена и обективизирана ролята на ензима ADA като маркер отразяващ системните процеси, проявяващи се при хроничното чревно възпаление.
8. Високият диагностичен потенциал на ензима ADA го превръща в полезен и ефективен маркер по отношение на диагностиката и мониторирането на ХВЧЗ.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена е високата диагностична надеждност на FC като специфичен и чувствителен маркер за локалното чревно възпаление, който успешно може да се прилага както при диагностиката, така и при мониториране на ХВЧЗ.

VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Yordanova M., Gerova D., Galunska B. Saliva application in oral and systemic diseases. Scripta Scientifica Medica, 2018;50(2), pp 39-44
2. Yordanova M., Gerova D., Atanassova A., Galunska B., Adenosine Deaminase as a Useful Biomarker for Diagnosis and Monitoring of Inflammatory Bowel Disease. Clin. Lab. 2020;66:1315-1323
3. Yordanova MG (2020) Salivary Changes in Helicobacter Pylori-Positive (HP+) Chronic Gastritis. Curr Trends Intern Med 4: 136. DOI: 10.29011/2638-003X.100036

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. М.Йорданова, Д.Герова, М.Бончева, „Изследване клетъчния състав на оралната течност при здрави лица без стоматологични проблеми“, X Национален конгрес по клинична лаборатория 7 - 9 септември 2017, Хотел Самоков, к.к. Боровец, р.55
2. М.Йорданова, Д.Герова, М.Бончева, „Оксидативен стрес при пациенти с артериална хипертония при спазване на строга беззеленчуково-плодова диета“, X Национален конгрес по клинична лаборатория 7 - 9 септември 2017, Хотел Самоков, к.к. Боровец, р.54
3. Yordanova M., D. Gerova, A. Atanasova, B. Galunska. Comparative analysis of salivary cellular composition in patients with chronic gastrointestinal diseases. 8-th Annual Assembly of IMAB 13-16 May 2018
4. Йорданова М., Д. Герова. Саливарна диагностика – настояще и бъдеще. XI-та Национална конференция по Клинична лаборатория, 27-29 Септември 2018, гр. Пловдив
5. Йорданова М., Д. Герова, Б. Галунска. Валидиране на метод за определяне на нитрити в слюнка. XI-та национална конференция по клинична лаборатория, 27-29 Септември 2018, Гранд Хотел Пловдив, гр. Пловдив (постер)
6. М. Бончева, М. Йорданова, Св. Лукова, М. Стефанова. „Изследване на метаболитите на оксидативния стрес. Набор от шест теста XI Национална конференция по Клинична лаборатория 27.09.2018 - 29.09.2018 Гранд Хотел Пловдив, гр. Пловдив
7. Йорданова М., Н. Шопов „Лабораторни слюнчени маркери за оценка на риска от гингивити при водолази. XII-та Национална конференция по авиационна, морска и космическа медицина, 18-20 Октомври, 2018, гр. Банкя
8. Mariana Yordanova, Daniela Gerova, Antonia Atanasova „Serum levels of adenosine deaminase in patients with Inflammatory Bowel Disease“, 29-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) 9- 12 May 2019, Varna, Bulgaria
9. Yordanova M., Gerova D., Atanasova A. Fecal calprotectin levels and degree of inflammation in inflammatory bowel disease patients, 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Barcelona 19-23.05.2019
10. Йорданова М., Д. Герова, А. Атанасова, Б. Галунска, „Слюнчени биомаркери при хронични възпалителни чревни заболявания“ XII Национална конференция по клинична лаборатория 4 - 6 октомври 2019, Ахелой, България
11. Yordanova M., Gerova D., Atanasova A., Galunska B., Oxidative status in patients with inflammatory bowel disease, XXVII Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting BCLF 2019 Анталия, Турция

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на шанса за това предизвикателство и възможността да изкача тази височина. В моя път не бях сама. Благодарна съм изключително на моя научен ръководител доц. Герова, не само за професионализма, но за търпението, отделеното време, добронамерената критика и изключителна помощ, които ми дадоха възможност да се уча.

Благодаря на проф. Маджова и проф. Бончева за това, че вярваха в мен и ме подкрепяха в това начинание и ми дадоха възможност да развия своя потенциал.

Благодаря на проф. Въжаров, който ме е подкрепял в редица трудни за мен моменти и за това, че ми гласува доверие вече толкова години от съвместната ни работа във МБАЛ – Варна.

Благодаря на проф. Галунска, която със своите ценни съвети спомогна да се справя и осъществя една от най-трудните части от този труд – разработването и валидирането на методите за ОС в слюнка.

Благодаря на д-р Албена Димитрова и доц. Антония Атанасова за съдействието по отношение на набирането и работата, свързана с пациентите с хронични заболявания на ГИТ от отделенията по гастроентерология на ВМА-Варна и МБАЛ „Св. Марина”.

Благодаря на лаборантките от Клинична лаборатория на ВМА- Варна и ДКЦ “Св. Марина“ - Варна, че винаги съм можела да разчитам на тях.

Благодаря на фирма Аквахим за съдействието и снабдяването с подходящите и необходими реактиви, за да се осъществи аналитичната част на проучването.

Както и на моето семейство и приятели, които са ми давали кураж и своята любов.