

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ
КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ „АКАД. ТАШО ТАШЕВ“
УМБАЛ „ЦАРИЦА ЙОАННА – ИСУЛ“ ЕАД

Д-Р ИВАН АЛЕКСАНДРОВ ЛЮТАКОВ

**Клинична оценка и биомаркери при пациенти с хронична диария
дължаща се на микроскопски колит, синдром на дразнимото черво и
хронични възпалителни заболявания на червата в ремисия**

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

Научна специалност – гастроентерология – 7.1

Научен ръководител:

Доц. д-р Пламен Иванов Пенчев, дм

София, 2019г.

"Най-големият враг на познанието не е
невежеството, а е илюзията за познание."

- Стивън Хокинг

Изказвам сърдечна благодарност на научния си ръководител
доц. Пламен Пенчев за ценните напътствия и всестранната помощ.
Благодаря на всички колегите от Катедра по Гастроентерология и специални
благодарности на д-р Радислав Наков, д-р Терзиев, д-р Кьосева, д-р М.
Четирска и д-р Б. Асенова, А. Димов, д-р Х. Вълков и проф. Владимироз за
подкрепата при разработването на този труд. Специални благодарности на
Dott. F. Ursini за подкрепата в изграждането на методологията.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. СЪКРАЩЕНИЯ	11
2. СПИСЪК С ТАБЛИЦИ И ФИГУРИ.....	14
3. ВЪВЕДЕНИЕ.....	23
4. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	24
4.1 Въведение.....	24
4.2 Хронична диария – определение и диагностичен алгоритъм.....	26
4.2.1 Диагностични тестове за хронична диария.....	28
4.2.2 Последователен подход при пациент с хронична диария	29
4.3 Микроскопски колит.....	30
4.3.1 Определение и патогенеза	30
4.3.2 Честота и разпространение	32
4.3.3 Рискови фактори (Тютюнопушене)	35
4.3.4 Диагноза.....	37
4.3.5 Ендоскопски изменения при МК	38
4.3.6 Клиничен ход и риск от колоректален карцином (КРК)	40
4.3.7 Лечение на МК	42
4.4 Малабсорбция на жлъчни киселини (МЖК)	43
4.4.1 Класификация на МЖК.....	43
4.4.2 Патопфизиология на ЖК.....	44

4.4.3	Честота и разпространение на МЖК сред населението	46
4.4.4	Диагностични тестове за малабсорбция на жлъчни киселини...	47
4.4.5	Фарнезоид X рецептор (FXR).....	48
4.4.6	¹⁴ C-glycocholate: Дихателен тест	49
4.4.7	Емпиричен тест с хелатори на жлъчни киселини.....	49
4.4.8	⁷⁵ SeHCAT - ⁷⁵ Selenium homotaurocholic acid test	49
4.4.9	Серумен Fibroblastic growth factor 19 (FGF-19)	51
4.4.10	Серумен 7-alfa-hydroxy-4-cholesten-3-one (C4).....	52
4.4.11	Общи и индивидуални жлъчни киселини във фецес за определяне на МЖК	52
4.4.12	Серумно измерване на тотални (общи) и индивидуални жлъчни киселини.....	54
4.4.13	Лечение на МЖК	54
4.5	Еозинофили в гастроинтестиналния тракт (ГИТ).....	56
4.5.1	Ролята на еозинофилите и хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ).....	57
4.5.2	Eosinophil-derived Neurotoxin/Eosinophil protein x (EDN/EPX) ..	58
4.5.3	Фекалните маркери при IBD и МК	59
4.6	Сравнение на диагностичната точност на различните биомаркери ...	61
4.6.1	Биомаркери за малабсорбция на жлъчни киселини (сравнителна характеристика).....	61

4.6.2	Мета-анализ на диагностичната приложимост (Diagnostic yield) на различните методи за доказване МЖК спрямо чревното възпаление	63
4.6.3	Сравнение на фекални биомаркери за чревно възпаление	66
4.7	Хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ, IBD) в ремисия и необяснима хронична персистираща диария	67
4.7.1	Биохимична и ендоскопска ремисия при ХВЗЧ	68
4.7.2	Малабсорбция на жлъчни киселини при ХВЗЧ в ремисия	69
4.8	Хронични възпалителни заболявания на червата след хирургична интервенция	70
4.8.1	Ролята на обема на тънкочревна резекция при IBD	71
4.8.2	Диагностични тестове за МЖК при тънкочревна резекция	71
4.8.3	Лечение на МЖК при ХВЗЧ след тънкочревна резекция	73
5.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	74
5.1	Цел	74
5.2	Задачи	74
6.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	76
6.1	Групи изследвани лица по диагнози	76
6.1.1	Група 1 (Active IBD) – Болест на Крон и Улцерозен колит в активност	76
6.1.2	Група 2 (IBD in Remission) – БК и УК в ендоскопска ремисия и налична хронична водниста диария	79
6.1.3	Група 3 (IBD after surgery) – БК и УК след хирургична интервенция с хронична водниста диария	80

6.1.4	Група 4 (IBS-D) – Синдром на дразнимото черво с диария	81
6.1.5	Група 5 (MC) – Микроскопски колит (МК)	82
6.1.6	Група 6 – Здрави доброволци (Контролна група)	83
6.2	ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ	84
6.2.1	Включващи и изключващи критерии	84
6.2.2	Анамнеза и физикален статус на пациентите и контролите	84
6.2.3	Определяне на клиничната и ендоскопска активност (използвани скорови системи за БК и УК).....	87
6.2.4	Лабораторни изследвания, микробиология и дихателен тест....	92
6.2.5	Абдоминална ехография	92
6.2.6	Изследване на фекален калпротектин	93
6.2.7	Изследване на фекален Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX).....	94
6.2.8	Изследване на жлъчни киселини във фецес - total free faecal bile acids (TFFBA)	95
6.2.9	Изследване на серумен fibroblast growth factor 19 (FGF-19)	96
6.2.10	Видеогастроскопия с вземане на материал за хистологично изследване от дванадесетопръстника	97
6.2.11	Видео илеоколоноскопия с вземане на хистологичен материал от терминален илеум и дебело черво.....	98
6.2.12	Протокол за вземане на биопсии при микроскопски колит	99
6.2.13	Хистологична оценка на биопсичен материал от терминален илеум и дебело черво.....	100

6.2.14	Статистически методи.....	101
6.2.15	Етични норми.....	101
6.2.16	Начин на финансиране на проучването.....	102
7.	РЕЗУЛТАТИ.....	103
7.1	Диагностичен алгоритъм за клинична оценка на пациенти с хронична водниста диария.....	103
7.1.1	Анализ на специфичния въпросник (анкета) за съставяне на диагностичен алгоритъм при пациенти с хронична диария.....	104
7.1.2	Микробиологично и паразитологично изследване на фецес ...	110
7.1.3	Алгоритъм за пациенти с хронична диария.....	112
7.2	Микроскопски колит (МК).....	114
7.2.1	Дескриптивна статистика на МК.....	115
7.2.2	МК и прием на медикаменти (НСВПС, Сартани, ППИ).....	118
7.2.3	Тютюнопушене, холецистектомия и CRP при МК.....	121
7.2.4	Ендоскопски изменения при МК.....	122
7.2.5	Хистологични резултати от биопсия на дебело черво.....	126
7.2.6	Горно-ендоскопско изследване (ФГС) при МК.....	130
7.2.7	Хистологични резултати от дуоденална биопсия при МК.....	131
7.3	Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) и фекални жлъчни киселини (TFFBA).....	133
7.3.1	Определяне на чувствителността и специфичността на FGF19 за откриване на МЖК при IBD и МК.....	136

7.3.2	IBD в активност и FGF19	137
7.3.3	IBD (remission) в ремисия с необяснима хронична диария и стойностите на серумния FGF19	137
7.3.4	IBD (IR-CD и IPAA) след хирургична интервенция и FGF19..	137
7.3.5	IBS-D и FGF19.....	138
7.3.6	Микроскопски колит (МК) и FGF19.....	138
7.4	Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX)	140
7.4.1	EDN/EPX при пациенти с ХВЗЧ в активност (IBD Active).....	142
7.4.2	Комбиниран ROC анализ със зона под кривата (AUC) при комбиниране на ФКП и EDN/EPX	145
7.4.3	Разпределение на EDN/EPX по групи пациенти	146
7.4.4	EDN/EPX и МК.....	146
7.5	Сравнителен анализ на FGF19, TFFBA, EDN/EPX спрямо ФКП клинични и ендоскопски маркери за тежест на диарията	148
7.5.1	Анализ на клиничните данни за тежестта на хроничната диария в нашата кохорта.....	148
7.5.2	EDN/EPX спрямо ФКП и CRP (като маркери на възпаление).149	
7.5.3	Линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП	150
7.5.4	Индекси за оценка на болестна активност и оценка тежестта на диарията (CDAI, Mayo score и SI) - корелация със стойностите на EDN/EPX.....	152
7.5.5	Корелация между EDN/EPX и ФКП	155

7.5.6	Сравнение на END/EPX с периферния брой на Еозинофили в кръвта	163
7.5.7	Микроскопски колит срещу IBS-D (ROME IV критерии), нощна диария, демографски показатели (възраст, пол).....	164
7.5.8	FGF-19 спрямо Stool Index и честотата на изхожданията при Микроскопски колит (МК)	166
7.5.9	Маркери за МЖК (FGF-19 и TFFBA) спрямо ФКП.....	166
7.5.10	Корелация между FGF-19 със stool index (SI) и честота на изхожданията (със или без корекция на маркерите за чревното възпаление).....	167
7.6	БК и УК в ендоскопска ремисия и налична необяснима хронична водниста диария	169
7.6.1	FGF19 и IBD в ремисия с необяснима хронична диария.....	169
7.6.2	Диагностична точност на FGF-19 за откриване на МЖК при IBD в ремисия с необяснима хронична диария	171
7.6.3	Корелация на FGF-19 спрямо Stool Index при пациенти в IBD ремисия.....	171
7.7	БК и УК след хирургични интервенции (десностранна хемиколектомия, тънкочревна резекция или IPAA)	172
7.7.1	Разпределение по типа операция и стойностите на FGF-19.....	173
7.7.2	Корелация между FGF-19 и тежестта на диария при IBD след хирургична операция	177
7.7.3	Маркери на чревно възпаление при оперирани IBD болни	177

7.7.4	Корелация между EDN/EPX и CDAI при оперирани болни	179
8.	ДИСКУСИЯ.....	180
9.	ИЗВОДИ.....	196
10.	ПРИНОСИ	197
11.	СТРАТЕГИЯ И ПОДХОД ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНА ВОДНИСТА ДИАРИЯ	198
12.	ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	199
12.1	Публикации във връзка с дисертацията.....	199
12.2	Международни участия на конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията.....	199
12.3	Национални конгреси и участия във връзка с дисертацията.....	200
13.	ОДОБРЕНИ НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	201
14.	БЪДЕЩИ ПРОЕКТИ И НАУЧНИ РАЗРАБОТКИ	202
15.	ПРИЗНАТЕЛНОСТ	203
16.	БИБЛИОГРАФИЯ	204

1. СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

БК – болест на Крон

ВЧЗ – възпалителни чревни заболявания

ГИ – гастроинтестинален

ГЕ - Глутенова ентеропатия

ГИТ - гастроинтестинален тракт

ЖК – Жлъчни киселини

ИПП – инхибитори на протонната помпа

КАТ - компютър-аксиална томография

КП – калпротектин

КРК – Колоректален Карцином

КК – Колагенов колит

ЛК – Лимфоцитен колит

МК – Микроскопски колит

МЖК – малабсорбция на жлъчни киселини

НСПВС - нестероидни противовъзпалителни средства

ТЧБСР – Тънкочревн бактериален свръх растеж

СУЕ - скорост на утаяване на еритроцитите

СДЧ – Синдром на дразнимото черво

СДЧ-Д – Синдром на дразнимото черво с диария

УК – улцерозен колит

ФКП - фекален калпротектин

ФГС – фиброгастроскопия

ФКС - фиброколоноскопия

ХВЗЧ - Хронични възпалителни заболявания на червата

ЯМР - ядрено-магнитен резонанс

На латиница:

5-ASA - 5-аминосалицилова киселина

AGA – American Gastroenterology Association

AUC - area under the curve

BSS - bristol stool scale form

CDAI - Crohn's Disease Activity Index

CDEIS - Crohn's disease endoscopic index of severity

CRP - C-реактивен протеин

CC – Collagenous Colitis

ECCO - European Crohn's and Colitis Organization

Eo - Eosinophils

EMS - Endoscopic Mayo Score

ENS - Enteric nervous system

EMCG – European Microscopic Colitis Group

EDN/EPX - eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x

ELISA - enzyme linked immunosorbent assay

FICE - Fujinon Intelligence Color Enhancement

H&E - hematoxylin and eosin stains

HD - High definition

HPLC - high-performance liquid chromatography

HS – Healthy subjects

IBD - Inflammatory Bowel Disease

IPAA - ileal pouch-anal anastomosis

IBS – Irritable Bowel Syndrome

IBS-D - Irritable Bowel Syndrome with diarrhea subtype

IL – interleukins

IR-CD – Ileal resection Crohn diseases

IEL - Intraepithelial Lymphocytes

MC – Microscopic Colitis

MCi – Microscopic colitis incomplete

LC – Lymphocytic Colitis

NPV – Negative predictive value

NBI - narrow band imaging

NR-CD – Non-resected Crohn diseases

PPV – Positive predictive value

RCT – Randomized clinical trials

SeHCAT - (75) Selenium homotaurocholic acid test

SIBO – small bacterial overgrowth

TNF α - тумор некрозис фактор алфа

2. СПИСЪК С ТАБЛИЦИ И ФИГУРИ

Таблица 4-1. Географските вариации в честотата и разпределението на пациентите с МК и двата подвида (КК и ЛК).....	33
Таблица 4-2. Сравнителна характеристика на всички методи за МЖК [74].....	62
Таблица 4-3. Сравнителна характеристика на фекалните маркери за чревно възпаление [93][105][106][7][6][104].....	66
Таблица 6-1. Анкетна карта (въпросник) за пациенти с хронична диария	87
Таблица 6-2. Индекс на Best - Crohn's disease activity index (CDAI)	88
Таблица 6-3. Виенска и Монреалска класификация за БК [119][120]	89
Таблица 6-4. Монреалската класификация за обхвата на УК	90
Таблица 6-5. Мауо-класификация (скор) за оценка на тежестта при УК [116][120][123].....	90
Таблица 6-6. Ендоскопско точкуване (скорирание) при УК според EMS [116][120][123].....	91
Таблица 6-7. Rutgeerts score за стадиране при БК след резекция	92
Таблица 7-1. Разпределение по диагнози и брой пациенти	104
Таблица 7-2 Bristol stool scale при различните групи	105
Таблица 7-3. Докладване на кръв в изпражненията от пациентите в различните групи	106
Таблица 7-4. Chi-Square test за откриване на значимост между групите по отношение на наличие на кръв в изпражненията	107
Таблица 7-5. Сравнителна характеристика на допълнителна коморбидност между различните групи пациенти включени в анализа ..	108

Таблица 7-6. Брой на пациентите докладвали за слуз в изпражненията при различните групи пациенти.....	109
Таблица 7-7. Chi-Square тест за слуз в изхожданията между различните групи	109
Таблица 7-8. Дескриптивна статистика на докладвания приема на медикаменти при различните групи пациенти.	110
Таблица 7-9. Копрокултура (фецес) микробиология при всички пациенти	111
Таблица 7-10. Паразитологично изследване на фецес при всички пациенти	111
Таблица 7-11. Маркери на интестинално възпаление и биомаркери за МЖК при МК.....	115
Таблица 7-12. Дескриптивна статистика свързана с диаричните изхождания на пациентите с МК и останалите групи.....	116
Таблица 7-13. Дескриптивни данни за МК спрямо другите групи по отношение за показатели за общо състояние	118
Таблица 7-14. Прием на НСПВС сред изследваната популация.....	119
Таблица 7-15. Chi-Square test за значима връзка между приема на НСПВС и МК	119
Таблица 7-16. Прием на ИПП сред изследваната популация	120
Таблица 7-17. Chi-Square test за значимост при приема на ИПП сред изследваните групи.....	120
Таблица 7-18. Прием на Сартани сред МК и взаимовръзката с другите групи	120
Таблица 7-19. Тютюнопушене сред всички групи пациенти. Няма статистически значима разлика Chi-square test ($p = 0.442$).....	121

Таблица 7-20. Дескриптивни данни за ендоскопските изменения открити при различните групи пациенти.....	122
Таблица 7-21. Chi-square test за взаимовръзка между ендоскопските изменения при различните групи пациенти.	123
Таблица 7-22. Средни стойности на IEL при МК и IBS-D от хистологичен резултат.	126
Таблица 7-23. Разпределение на всички пациенти изследвани и преброени IEL в хистология от дебело черво.....	126
Таблица 7-24. Chi-Square test за зависимост между IEL и МК с другите групи.	127
Таблица 7-25. Средни стойности на колагенов слой при КК и IBS-D ...	127
Таблица 7-26. Размера на колагеновия слой при всички изследвани пациенти с МК и IBS-D.....	128
Таблица 7-27. Корелация между дебелината колагеновия слой и броя на изхожданията дневно при МК.....	130
Таблица 7-28. Резултати от горно-ендоскопските протоколи при всички групи пациенти.....	131
Таблица 7-29. Не се установява статистическа взаимовръзка между резултатите от различните ендоскопски протоколи между различни групи изследвани пациенти	131
Таблица 7-30. Хистологичните резултати от ФГС на всички групи пациенти	132
Таблица 7-31. Статистически значима взаимовръзка между хистологичните резултати при различните групи пациенти от дуоденална биопсия на МК (Chi-Square test).	132

Таблица 7-32. Дискриптивна статистика на резултатите на FGF19 и TFFBA в различните групи пациенти	134
Таблица 7-33. Диагностичната точност на FGF19 спрямо здрави контроли	136
Таблица 7-34. Описателни характеристики на EDN/EPX, FCP и CRP при отделните групи пациенти	141
Таблица 7-35. Чувствителност и специфичност на фекалния eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX) и Фекален калпротектин (FC, ФКП)	142
Таблица 7-36. Чувствителност и специфичност на ФКП при (cut-off) 100 µg/g, EDN/EPX и CRP за чревно възпаление при пациенти с хронична диария.....	143
Таблица 7-37. Стойности на EDN/EPX и FCP при диагнозите БК и УК сравнени при пациенти в активност или ремисия	144
Таблица 7-38. Сравнение между stool index и честотата на изхожданията при различните групи пациенти.....	149
Таблица 7-39. Средни стойности и 10-90 перцентил на ФКП и EDN/EPX	149
Таблица 7-40. Сравнение на средни стойности и стандартното отклонение на ФКП и EDN/EPX при IBD active и IBD в ремисия.....	151
Таблица 7-41. Levene's Test for Equality of Variances за стойностите на ФКП и EDN/EPX.	151
Таблица 7-42. ФКП и EDN/EPX при IBD active и здрави контроли	152
Таблица 7-43. Levene's Test for Equality of Variances за IBD active и здрави контроли	152

Таблица 7-44. Корелация между EDN/EPX и индекси за оценка на болестна активност (CDAI и Mayo) с ендоскопския скор (EMS).....	153
Таблица 7-45. Корелация между EDN/EPX със Stool Index и Stool frequency/day	153
Таблица 7-46. Анализ за наличие на зависимост между EDN/EPX и EMS, BSS, Eo count и тютюнопушенето	154
Таблица 7-47. Анализ на индексите за оценка на болестна активност при IBD.....	155
Таблица 7-48. Корелация между EDN/EPX и ФКП, CRP, Mayo score, CDAI, и SI и биомаркерите за МЖК. В зелено са обозначени резултатите където има сигнификантна корелация.	156
Таблица 7-49. Корелация на EDN/EPX с IPAA, Crohn after surgery (IR-CD), ROME IV критериите и редукцията на килограмите.....	157
Таблица 7-50. Корелация между нивата на EDN/EPX спрямо резултатите от ендоскопските протоколи (находки по време на колоноскопия).....	158
Таблица 7-51. Корелация (Spearman's) на фекалния EDN/EPX, FCP и CRP за всички групи пациенти.....	159
Таблица 7-52. Корелация на маркерите в група 1 (IBD Active).....	160
Таблица 7-53. Отрицателна корелация при IBD в ремисия между EDN/EPX и FCP.....	160
Таблица 7-54. Корелация между EDN/EPX и ФКП при IBD след хирургични интервенции (илеална резекция или J-pouch anastomosis)	161
Таблица 7-55. Корелация на EDN/EPX и ФКП при IBS-D	161

Таблица 7-56. Корелация между EDN/EPX и ФКП при Здрави контроли.	162
Таблица 7-57. Средни стойности на ФКП и EDN/EPX при IBD Active и IBD in remission.	162
Таблица 7-58. Сигнификантна зависимост между EDN/EPX и FCP при пациенти с IBD Active и IBD in remission (Levene's Test for Equality of Variances).	163
Таблица 7-59. Pearson Chi-Square за EDN/EPX и периферни Еозинофили в кръвта.	163
Таблица 7-60. Сравнителна характеристика на маркерите за тежест на диарията спрямо отделните групи	165
Таблица 7-61. Корелация на FGF-19 с колагеновия слой (с или без корекция)	166
Таблица 7-62. Корелация на FGF-19 с другите показатели (със и без корекция на маркерите за чревното възпаление и възрастта)	168
Таблица 7-63. Стойностите на FGF-19 спрямо SI, брой изхождания при всички групи пациенти.	170
Таблица 7-64. FGF-19 корелира със SI и честотата на изхождания при IBD ремисия. Проведена корекция на възпалителните компоненти (corrected)	171
Таблица 7-65. Брой пациенти оперирани чрез J-rouch анална анастомоза (IPAA) сравнено с другите пациенти от IBD групите.	172
Таблица 7-66. Разпределение на болните с БК, които са след илеална резекция спрямо тези с БК в ремисия и активност	173

Таблица 7-67. Chi-Square Test за откриване на взаимовръзка при маркерите на чревно възпаление между групите с БК в активност и ремисия.173

Таблица 7-68. Дескриптивни стойности на FGF19, TFFBA, FCP и EDN/EPX при здрави контроли, пациенти с IBD след хирургична интервенция спрямо операцията и активността на заболяването.....174

Таблица 7-69. Корелационен анализ на FGF-19 и SI (stool frequency/day) при IBD резидирани177

Таблица 7-70. Independent Samples Test между IR-CD в ремисия и здрави контроли за EDN/EPX.....179

Таблица 7-71. Корелационна зависимост между EDN/EPX и CDAI при оперирани БК болни (ремисия и активност).....179

81 таблици

ФИГУРИ - 30

Фигура 1. Схематични представяне на ХВЗЧ и подвидове на МК31

Фигура 2. Извлечената честота е изчислена на база МК на 100 000 човека-години в риск*.34

Фигура 3. Извлечени брой случаи на КК на 100 000 човека-години с риск да развият КК за Южна Европа. $I^2 = 85.65\%$35

Фигура 4. Преизчислен сбор на статуса на пушачите като рисков фактор за развитие на МК, показан като Odds Ratio (OR) между сегашни пушачи срещу непушачи (включително бивши пушачи и никога не пушили* [37].....36

Фигура 5. Обобщен анализ за риска от развитие на аденоми на дебело черво при МК изобразен като Odds Ratio (OR) между МК и контроли*.41

Фигура 6. Обобщен анализ за риска от развитие на КРК при МК изобразен като Odds Ratio (OR) между МС и контроли*.....	42
Фигура 7. Ентерохепаталния кръговрат и ролята на FXR рецептора и FGF-19 в регулацията на синтеза на жлъчни киселини	45
Фигура 8. Подробен патофизиологичен цикъл на МЖК.....	46
Фигура 9. Мета-анализ на 16 проучвания изследващи чувствителност и специфичност на различните тестове за МЖК. Мета-анализът определя true positive cases (events rate) в тези проучвания и дава $p < 0.001$ [103]..	63
Фигура 10. Мета-Анализ на 3 проучвания сравняващи едновременно С4 и SeHCAT с изобразен Odds Ratio ($p = 0.930$).	64
Фигура 11. Мета-анализ за Odds Ratio за МЖК между FGF-19 и С4.....	65
Фигура 12. Демографско разпределение на пациентите с болест на Крон (БК) по възраст, локализация на заболяването и ход на протичане.....	77
Фигура 13. Демографско разпределение на пациентите с улцерозен колит (УК) по разпространеност на заболяването.....	78
Фигура 14. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)	113
Фигура 15. Лимфоликуларна реакция в терминалния илеум на пациент с КК и вземане на биопсия.	123
Фигура 16. Фоликул в терминален илеум чрез използването на NBI и разграничаване на покривния тънкочревен епител	124
Фигура 17. Огнищни минимални мукозни изменения по лигавицата на дебелото черво при пациент с ЛК чрез използването на NBI.	125
Фигура 18. Мукозни изменения при КК (хеморагии, ерозии, ранимост)	125
Фигура 19. Хистологичен препарат от КК и измерената дебелината на колагеновия слой.	128

Фигура 20. Хистологичен препарат Н&Е при КК и измерване на дебелината на колагеновия слой	129
Фигура 21 ROC крива с анализ на FGF19 (pg/ml), фекалните жлъчни киселини ($\mu\text{mol/g}$) и Фекалния калпротектин ($\mu\text{g/g}$) за откриване на МЖК	139
Фигура 22. ROC анализ със зона под кривата (AUC) на EDN/EPX сравнен с ФКП за чревно възпаление при хронична диария	144
Фигура 23. ROC анализ със зона под кривата (AUC) на комбинирането на двете ROC криви на ФКП и EDN/EPX.....	145
Фигура 24. NPV и PPV и цялостна диагностична точност на EDN и ФКП за откриване на интестинално възпаление при пациенти с хронична диария.....	146
Фигура 25. Разпределение на стойностите на END/EPX по групи.....	147
Фигура 26. Нива на END/EPX при различните групи пациенти 1- IBD Active, 2 – IBD Remission, 3 – IBD after surgery, 4 – IBS-D, 5 – MC и 6 - здрави контроли*.....	147
Фигура 27. Логаритмуваните стойности на маркерите при линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП.	150
Фигура 28. Vox-plot анализ на логаритмичните стойности на END/EPX и ФКП при различните групи пациенти.....	150
Фигура 29. Vox-plot анализ на стойностите на FGF19, TFFBA и ФКП при различните групи пациенти.....	167
Фигура 30. Диагностичен алгоритъм и подход при пациенти с хронична водниста диария	198

3. ВЪВЕДЕНИЕ

Причината за хроничната диария не винаги е морфологична и не винаги се доказва чрез ендоскопски изследвания на базата на структурни изменения по лигавицата на червото. За поставяне на точна диагноза се нуждаем от комплексна морфологична и функционална оценка на различни етиологични фактори. В днешно време все повече се използват не-инвазивни биомаркери, за да се установи дали диарията се дължи на „органична“ или „функционална“ причина, но все още няма общоприети стандарти и ендоскопските изследвания остават златен стандарт, а биомаркерите само насочват към диагнозата. Фекалният калпротектин е най-широко застъпения биомаркер за установяване на чревно възпаление и мониториране на пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ), но той не е толкова специфичен и е повишен при различни други възпалителни заболявания, което обуславя необходимостта от търсене на други биомаркери с цел по-специфично мониториране и разграничаване.

Малабсорбцията на жлъчни киселини (МЖК) е друго основно клинично състояние допринасящо за увеличаване на тежестта на хроничната диария при различни заболявания. Използваните нуклеарни методи за доказване на МЖК не са на разположение в клиничната практика на гастроентеролога на Р. България. Това обуславя нуждата от въвеждане на нови биомаркери за откриване на МЖК. В световен мащаб все повече работни групи насочват усилията си за въвеждане на нови биомаркери за стадиране степенната на МЖК с цел последващо лечение чрез хелатори на жлъчните киселини (холестирамин). Комплексната оценка на клиничните, лабораторните, образните и ендоскопските изследвания, осигурява насоките за правилен терапевтичен подход при пациенти с хронична диария.

4. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

4.1 Въведение

Диарията представлява диагностично и терапевтично предизвикателство за лекарите, защото може да има множество етиологични фактори [1][2]. Диагностичните тестове са много или може да не са на разположение в конкретните клинични звена [1][2]. Причината за диарията може да е много рядка, трудно доловима диагноза и адекватното лечение да не е възможно, което довежда до нуждата от нови проучвания и емпирична терапия [1][2]. Въпреки, че диарията може да е очевидна за пациента, първоначално трябва да се определят нейните основни характеристики: честота и консистенция на изхожданията [1][2]. Класификацията на диарията - разделя се на остра и хронична (повече от 4 седмици продължителност) [3]. Най-честата причина за остра диария е инфекциозен причинител, докато хроничната диария е по-малко вероятно да е предизвикана от инфекциозен причинител и трябва да се търси друга причина чрез различни диагностични методи [1][2] [4][5].

Хроничната диария е често патологично състояние и основен симптом на много заболявания, с докладвана честота от 4-5% в Западния свят. Разпространението (prevalence) варира според популацията и използваната дефиниция за диария. Най-честите причини за диария са функционалните чревни заболявания като синдром на дразнимото черво (СДЧ) и функционалната диария, които според много автори могат да бъдат разграничени от органичните заболявания чрез налични фекални биомаркери [6][7][8][9]. Сред най-честите органичните заболявания

причиняващи диария са хроничните възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ, IBD), ракът на дебелото черво (фамилен или спорадичен), микроскопски колит (МК) и малабсорбция на жлъчни киселини (МЖК) [10][11][12]. Голям брой от тези заболявания предизвикват хронична водниста диария, което диагностично предизвикателство [13][14][15]. Често е трудно да се направи подробна диференциална диагноза между различните органични и функционални заболявания при пациенти с хронична диария базирано само на историята на заболяването и физикалния статус. Обаче, наличието на алармиращи симптоми като анемия, ректално кървене и загуба на килограми са сред силните индикатори за органични заболяване [14]. Изследването на хроничната водниста диария включва разширени кръвни изследвания и микробиологични изследвания последвани от гастроскопия и колоноскопия с биопсии. При негативни резултати се препоръчва извършването на тестове за МЖК посредством сцинтиграфия с ^{75}Se -Selenium homotaurocholic acid test ($^{75}\text{SeHCAAT}$) [13][14].

Много е важно при пациенти с органична причина за диарията да се изследват подробно, за да се намери потенциално средство за лечение на откритото заболяване. От друга страна, пациентите с функционални заболявания на червата не трябва да преминават през прекалено много и ненужни изследвания за да се постави диагнозата им. В крайна сметка, идеалната дефиниция за хронична диария трябва да е лесно приложима и да помага за лесното разграничаване на функционална от органична причина на състоянието.

4.2 Хронична диария – определение и диагностичен алгоритъм

Класическата дефиниция за хронична диария е поне 3 изхождания дневно и фекално количество да е над 200г/дн., и продължителността на диарията да е повече от 4 седмици [13][14]. Така или иначе, тази дефиниция има своите ограничения. Първо, прецизността на тази дефиниция е била поставена под въпрос и много пациенти със значителни оплаквания и патологични отклонения от рутинните изследвания, които не са отговаряли на тази дефиниция са били в риск да бъдат изключени от последващи диагностични процедури. Второ, измерването на тежестта на фекалното съдържимо е основен „крайъгълен камък“, защото пациентите и персонала не съдействат за неговото правилно осъществяване. В действителност, класическата дефиниция често е модифицирана за да включи в себе си само честотата на изхожданията и времетраенето на диарията. Въпреки, че честотата на изхожданията е лесно да бъде определена, връзката с функцията на дебелото черво е по-трудна. Поради тези затруднения е нужно развитието на друга по-подробна дефиниция на хроничната диария, която да включва, честота, продължителност, обем и използването на по-нови и съвременни тестове за определяне формата на изхожданията посредством използване на “Bristol Stool Scale (BSS)” и конкретно типовете „type 6“ (кашави) или 7 (воднисти) [13]. Дефиницията за диария във връзка с консистенцията на изпражненията има теоретическо предимство, защото при предишни проучвания се установява корелационна връзка между консистенцията и транзитното време спрямо дефекацията [13][16].

Въпреки, че точна диагноза на етиологията на диарията и определяне точна разлика между стеатореята и възпалителната асоциирана диария

(секреторна) не винаги е възможно [15]. При съмнение за възпаление или възпалителен характер на диарията е редно да се изследват маркерите на възпаление CRP, Фекален калпротектин (ФКП) или други нови маркери на възпаление. Един скорошен систематичен обзор на литературата определи, че чувствителността на ФКП е 92% и специфичност до 82% за откриване на възпаление в дебелото черво [17]. Идеята на тези нови „биомаркери“ е да помогне на лекаря да „скринира“ по-лесно пациенти, които имат по-малка вероятност да имат диария от възпалителен характер. След провеждането на тези биомаркери при тези пациенти, лекаря може да се фокусира в търсене на друга причина, като например микроскопски колит, глутенова ентеропатия, irritable bowel syndrome-diarrrhea (IBS-D), функционална диария, МЖК, ТЧБСР, нарушение в диетата или мотилитетни нарушения.

Поради широката диференциална диагноза, лекарят се нуждае от подробно снемане на анамнеза за да може да се стесни кръга от последващи диагностични процедури [15]. Изключително важно е всички пациенти с хронична диария да се изследват за глутенова ентеропатия (ГЕ), защото има лесно изпълним маркер за „скрининг“, който е серумен anti-tTG (IgA+IgG), като важно условия е да се изследват тоталното ниво на серумния IgA. Другият важен тест е провеждането на ФГС с биопсия от парс десценденс дуодени и булбус дуодени с хистологична верификация по Марш класификацията [14].

Физикалният преглед е много важна стъпка за последващия диагностичен план, защото ще насочи към последващите диагностични средства и най-вече ще се търсят алармиращи симптоми.

4.2.1 Диагностични тестове за хронична диария

Най-важните етапи от диагностичния план са извършването на горно-ендоскопското изследване (ФГС) и колоноскопията (ФКС) с множество биопсии, като диагностичното им значение (diagnostic yield) се оценява от различни проучвания между 2% до 15% [14][15][12]. Най-честата причина за диария от органичен произход са IBD и микроскопски колит (МК), като последно време има сериозен дебат, дали да се биопсира колон асценденс при съмнение за МК [14][15][12]. При проучване проведено сред 28 000 пациента за хронична диария, се установява, че те рядко провеждат ФГС с биопсии и се установява, че най-честата диагноза е ГЕ и оскъдно количество лимфоцити в лигавицата, без да се установяват по-редките причини за хронична диария [14][15][12].

Кръвни тестове за невроендокринни тумори са друг важен компонент в алгоритъма за диагностика на хронична диария, но трябва да се има предвид, че тези тумори са много редки. Изследването на хромогрин А, гастрин, вазо-активен интестинален пептид и 5-хидрокси индолоцетна киселина не са с много висока диагностична стойност и много често резултатите от тези изследвания може да са гранични или фалшиво положителни, като по този начин се налага тези тестове да се извършват в по-късни етапи на диагностичния алгоритъм [14][15][12].

Фекалните копрокултури и паразитологични изследвания са стандартни тестове, които са едни от първите при оценка на пациент с хронична диария [12]. Следващите изследвания в етап на диагностичния процес на хроничната диария са провеждането на абдоминална ехография с цел изключване на патология на панкреаса (хроничен панкреатит, тумори на панкреаса или панкреасни резекции), както и патология на черния дроб и

жлъчната система. Абдоминалната ехография е лесен, достъпен и високо информативен метод за отхвърляне на евентуални причини за хронична диария преди провеждането на инвазивните изследвания [15][12].

Оценката на тънкочревен бактериален свръхрастеж (SIBO) се причинява от анатомични или функционални нарушения в червата, като стриктури, ахлорхидрия, мотилитетни нарушения, склеродермия, фистули, хирургични интервенции и съпътства някои заболявания на ГИТ. Златният стандарт за диагностика е чрез интестинален аспират, но се използват по-широко в практиката H₂-дихателните тестове с лактулоза [14][15][12].

4.2.2 Последователен подход при пациент с хронична диария

За правилния алгоритъм при подхождане към пациент с хронична диария, освен добре разработения въпросник за снемане на подробна информация за формата на изпражненията, броя на изхождания и продължителността, е много важна информацията за медикаментите, които приема пациентът. От първостепенно значение е да се установи дали пациентът има история за ректално кървене. Ако няма ректорагия, се преминава към това да се определи дали има данни за синдром на малабсорбция. Изследванията включват ПКК, биохимия, CRP, серумно желязо, фолати, вит. B12, фекална еластаза, хромогранин А, anti-tTG, тестове за МЖК и фекални биомаркери за чревно възпаление (ФКП). След това се пристъпва към абдоминална ехография, дихателни тестове и чак, след това към инвазивни ендоскопски изследвания [14][15][12].

След негативни ендоскопски изследвания трябва да се провери състояние на щитовидната жлеза, както и в по-редки случаи ХИВ инфекция. Ако всички тестове са негативни и пациентът отговаря на нужните критерии,

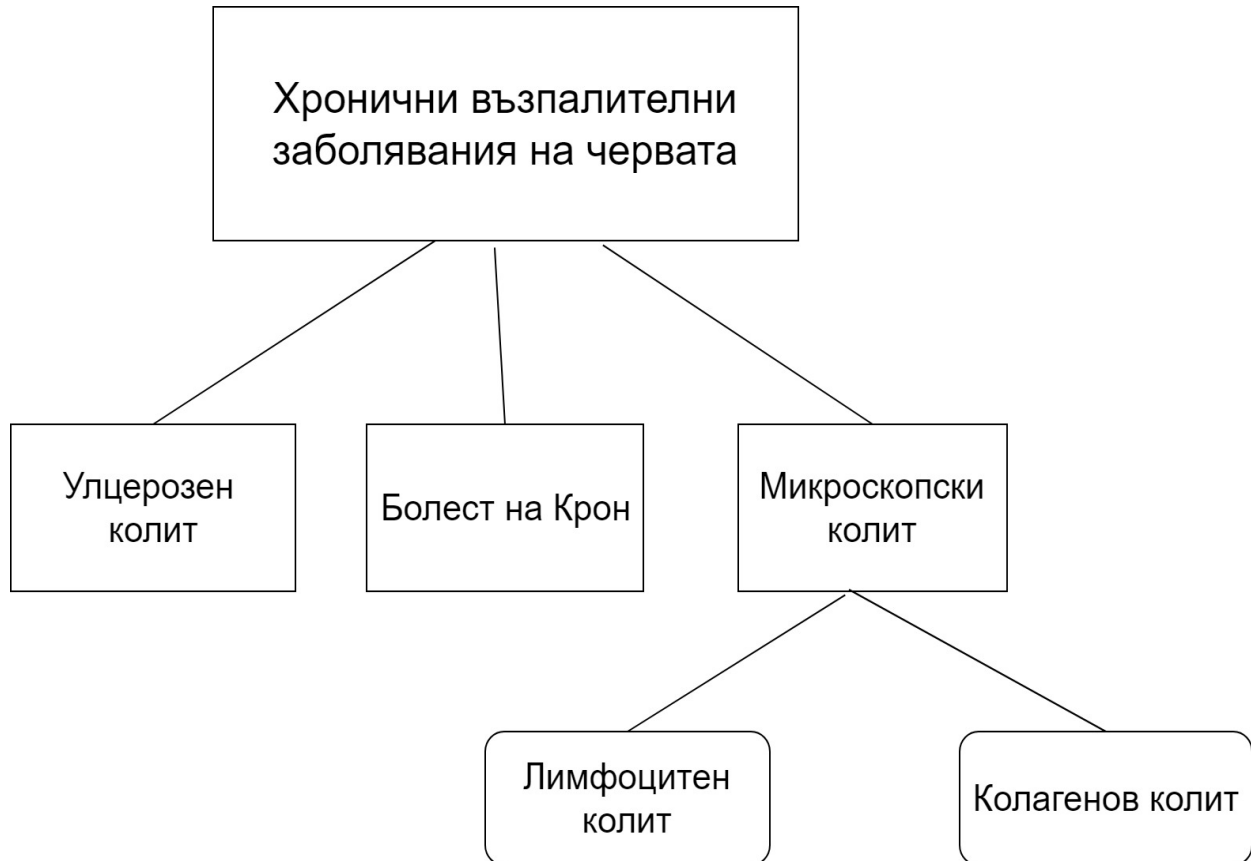
тогава може да поставим диагнозата СДЧ. Подходът при тези пациенти е много време-отнемащ, но целта на новите „биомаркери“ за чревни възпаление и МЖК цели да улесни този път и да спести ненужни скъпоструващи изследвания, особено, ако тези биомаркери са негативни [14][15][12].

4.3 Микроскопски колит

4.3.1 Определение и патогенеза

В последните години микроскопският колит (МК) се установява като честа причина за хронична водниста не-кървава диария, особено при възрастни жени. Терминът се използва като сборно понятие, което характеризира подгрупи от различни „колити“, които са с отчетлив клинично – патологичен фенотип и макроскопски нормална или почти нормална ендоскопска находка [1][2][18]. МК е възпалително чревно заболяване и въпреки, че е с доброкачествено протичане, се смята за нов член на групата хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ, IBD) [19]. Етиологията и патогенезата на МК са неизвестни, но се смята, че МК е мултифакторно заболяване, вероятно следствие на абнормна имунна реакция при предразположени индивиди, провокирана от различни луменни фактори (инфекции, лекарства, аутоимунитет и/или жлъчни киселини) [20]. Ключов момент в патогенезата на МК е дисфункцията на епителната бариера на чревната мукоза [2][20]. Някои автори предлагат включване на МК в класификацията на IBD, поради сходните патофизиологични механизми на хроничната диария и най-вече сходните терапевтични възможности при МК и IBD [21][22]. Доказателство за това е включването на МК към част от препоръките (консенсуси) за хистологично доказване на хронични

възпалителни заболявания на червата към Европейската Крон и Колит Организация (ЕССО) [23]. (Фигура 1).



Фигура 1. Схематични представяне на ХВЗЧ и подвидове на МК

Микроскопският колит се асоциира с автоимунни нарушения, като глутенова ентеропатия, полиартрити, щитовидна патология и много други автоимунни заболявания [24]. Ключовият симптом, който определя заболяването като активно е хроничната не-кървава диария (с над 3 изхождания дневно или над 1 воднисто изхождане дневно) [25][26]. МК представлява хистологична диагноза и тази клинична информация винаги трябва да се предоставя на патолога или да се описва в ендоскопския протокол [27]. МК е хронично възпалително заболяване, което в голяма степен нарушава качеството на живот на пациентите (HRQoL) [28].

4.3.2 Честота и разпространение

Честотата на МК се установява при 20 на 106 пациента с хронична диария в много държави по света, като средно 10 – 15% от всички пациенти с хронична водниста диария, които провеждат колоноскопия с множество биопсии, най-вече при възрастните пациенти [29][30][31]. Преди няколко години МК се смяташе за рядко заболяване, но последните епидемиологични проучвания документираха, че честотата на МК се увеличава в Западния свят с променливо географско разпределение. Все още сегашната епидемиология е неясна и поставена под дебат [32][33][34][35][36].

За да се установи точният брой на инцидентите на пациенти страдащи от хронична диария и диагностицирани с МК, тяхната честота и разпространението (prevalence rate) е извършен систематичен обзор и мета-анализ в базата от данни на MEDLINE и EMBASE където са проучени 1 446 публикации, от които са извлечени данните от 26 популационно-базирани проучвания в Северна Америка и Европа за МК до Декември 2018г. Хетерогенността между проучвания е била оценена чрез chi-square test (Cochran Q statistic) и стадирана чрез I^2 statistic. От резултатите от този мета-анализ се установява висока хетерогенност между групите в тези популационни проучвания (80%), като извлечения обща честота за МК е оценена като 11.9 нови случаи (95% CI, 8.97-14.81; $I^2=99.73\%$) на 100.000 човека годишно (N=21 проучвания) и 119 случая (95% CI, 73-166; $I^2=97.08\%$) на 100.000 човека (N=5 проучвания). Географските вариации в честотата и разпределението на пациентите с МК са описани на **Таблица 4-1** за различните региони и двата основни подвида (СС и LC). Намаления брой публикувани епидемиологични проучвания от Южна Европа спрямо

Северна Европа пречи на директното сравнение в честотата между двата региона [37].

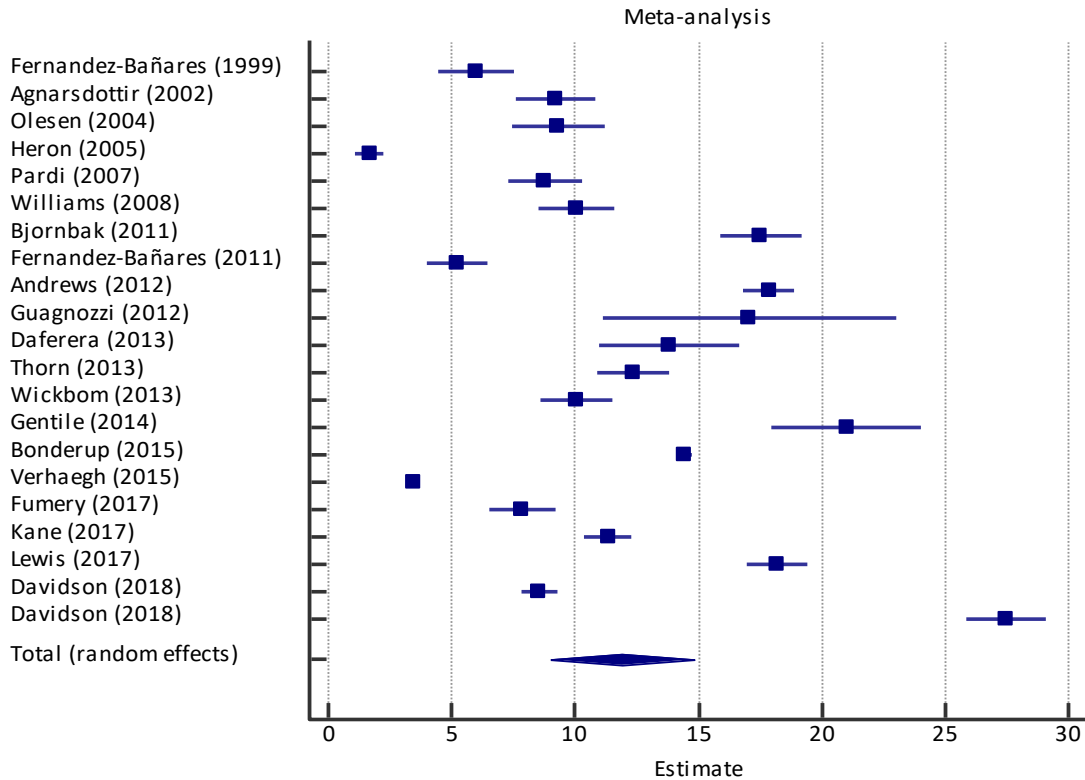
Географски региони	СС (95%CI)	LC (95%CI)	MC (95%CI)
Северна Европа	5.9 (4.6-7.4)	4.86 (3.54-6.2)	12.1 (8.3-15.84)
Южна Европа	2.4 (0.6-4.14)	3.1 (1.41-4.7)	7.5 (5.2-9.8)
Северна Америка	5.55 (3.4-7.4)	8.04 (5.04-11.04)	14.3 (8.9-19.8)

Таблица 4-1. Географските вариации в честотата и разпределението на пациентите с МК и двата подвида (КК и ЛК)

Субгрупов анализ на честота на МК свързана с пола е осъществена при 18 популационни проучвания и демонстрира сигнификантно по-висок риск при жените с (OR 2.54; 95%CI, 2.26-2.86; $I^2 = 86.71\%$), независимо от типа на проучването (ретроспективно или проспективно), нивото (национални, регионално или локално) и географското разпределение. От този мета-анализ, точната извлечена калкулирана честота на МК сред пациенти с хронична диария се изчислява на **12.8%** (95% CI: 9.9-15.9, $I^2=93.64\%$), като имаме предвид само проучвания със средна/високо качество (moderate/high quality) и размер на проучваните пациенти от всяко проучване е ≥ 100 (n=14 проучвания) [37]. Популационно базираните проучвания са с голяма хетерогенност и това може да се дължи на географски ширини, най-вероятно на фактори на околната среда, генетични особености и най-вече на различна информираност за съществуването на МК сред населението [32][33][34][35][36]. На (

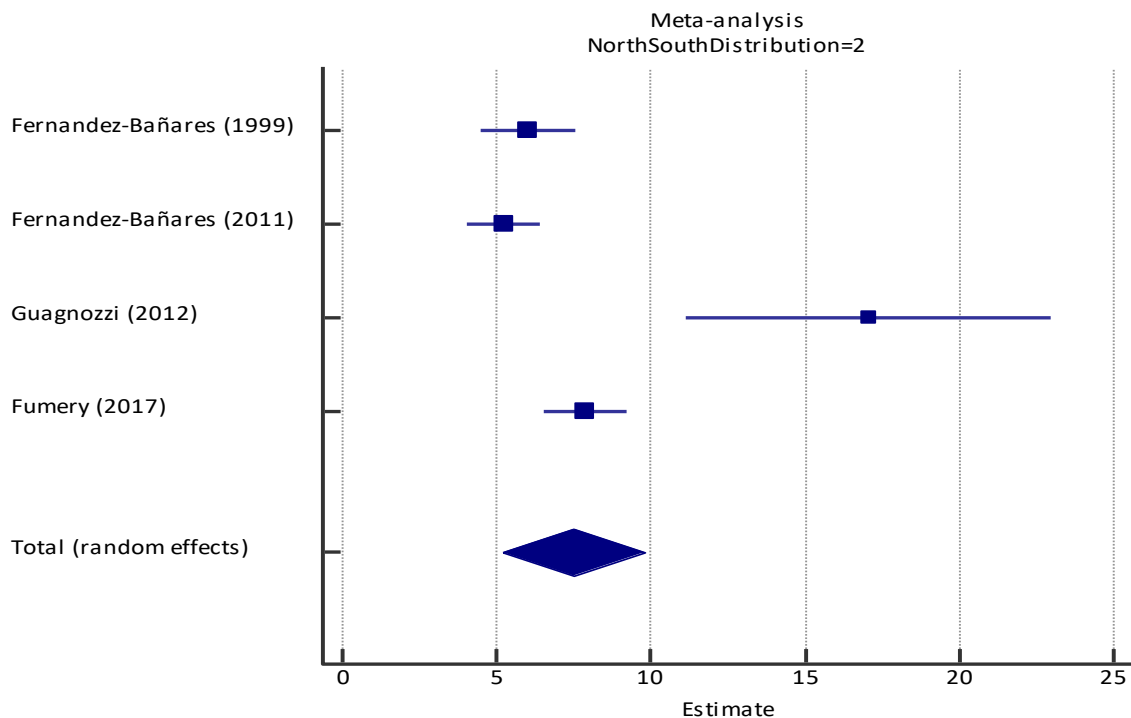
Фигура 2) може да се види общото разпределение на хетерогенността в избраните проучвания чрез Forest Plot анализа. На (**Фигура 3)** и (**Фигура 4)**

може да се види разпределение на проучванията в Европа спрямо Север-Юг градиент, като трябва да се интерпретират данните с внимание, поради малкия брой и не-хомогенните проучвания [37].



Фигура 2. Извлечената честота е изчислена на база МК на 100 000 човека-години в риск*.

*Стойността „I² value“ (статистическа хетерогенност) е 99.73%, което индицира високи между популационни различия в общия ефект на изучаваната популация



Фигура 3. Извлечени брой случаи на КК на 100 000 човека-години с риск да развият КК за Южна Европа. $I^2 = 85.65\%$.

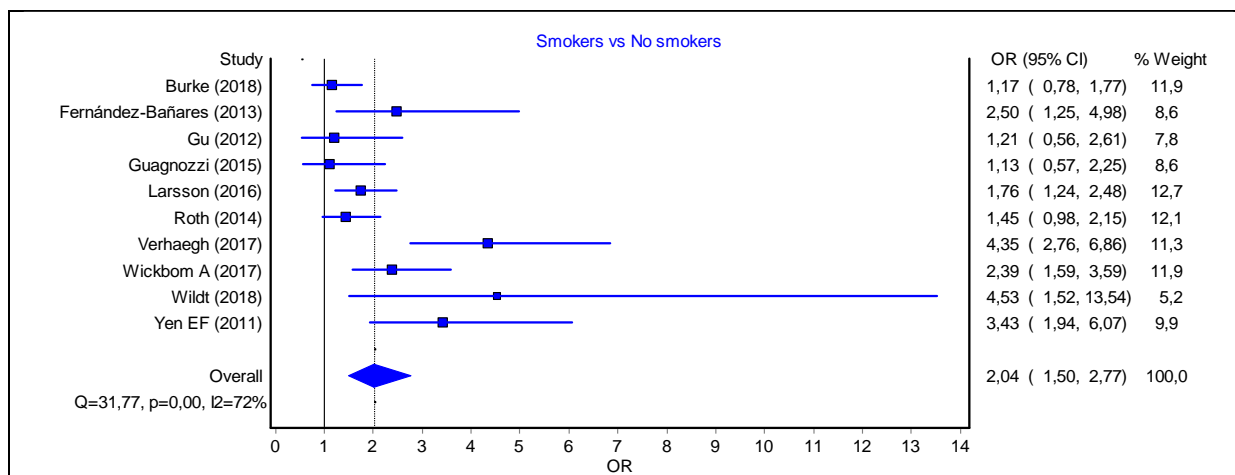
Повече проспективни, по-обемни и обширни мултицентрични проучвания са нужни за по-добрата оценка на епидемиологичната обстановка на пациенти с МК са нужни в бъдеще [37].

4.3.3 Рискови фактори (Тютюнопушене)

Тютюнопушенето е рисков вреден навик въввлечен в патогенезата на ХВЗЧ и също е идентифициран като независим рисков фактор за развитието на МК, въпреки, че молекулярните механизми по които действа не са напълно изяснени [37][38].

При проведения мета-анализ от прегледани 408 публикации свързани с МК и тютюнопушене, след оценка са включени в мета-анализа 20

проучвания свързани с МК и тютюнопушене, като честотата на пушачите сред диагностицираните пациенти с МК варира от 15.3% до 40.7% (13.6-37.1% за КК и 13.2-26% за ЛК) като те са сравнени с контролната група, честота на пушачите варира от 5% до 28.2% (Фигура 4).



Фигура 4. Преизчислен сбор на статуса на пушачите като рисков фактор за развитие на МК, показан като Odds Ratio (OR) между сегашни пушачи срещу непушачи (включително бивши пушачи и никога не пушили* [37].

*Стойността I^2 value (статистическа хетерогенност) на 99.9% показва голяма вариабилност между групите

Досега при нито едно проучване не е изследван ефекта от спирането на тютюнопушенето върху клиничния ход на МК. От наличните в момента данни от литературата, може да се предполага, че тютюнопушенето повлиява имунопатогенетичните механизми на МК и старта на заболяването, но няма реална клинична значимост за изхожда от заболяването и промяна на хода на заболяването [37]. Като заключение, авторския колектив на мета-анализа твърди, че тютюнопушенето е рисков фактор за развитието на МК и

спомага по-ранно стартиране на заболяването, но не се установява разлика в хода на заболяването или отговора към КС [37].

4.3.4 Диагноза

Диагнозата МК се поставя по-лесно, когато общопрактикуващите лекари, гастроентеролозите, ендоскопистите и патолозите са информирани и мотивирани да търсят това заболяване [28]. МК е хистологична диагноза и хистологията е златен стандарт за да се постави диагнозата [18][24]. Задължително трябва да се вземат множествени биопсии от дебело черво от ендоскопистта при всички пациенти с хронична диария, след което да се преброят внимателно от патолога броят на интраепителните лимфоцити (IEL) и да се измери дебелината субепителния колагенов слой на микроскоп снабден с окулярмикрометър или софтуер за измерване на дебелината на колагеновия слой. Съществуват три хистологични субкласа: Колагенов колит (КК), Лимфоцитен колит (ЛК) и Непълен микроскопски колит (МСi) [18][24][39][40]. Характерно в хистологията на МК е изобилна инфилтрация от възпалителни клетки (IEL) в чревната мукоза, които са нормални по форма и големина [18]. Мукозният слой е с нормална архитектура на криптите [18]. При Лимфоцитен Колит (ЛК) се установява увеличение на интраепителните лимфоцити с над 20 на 100 епителни клетки на зрително поле [18]. Колагеновият колит (КК) се характеризира с увеличение на дебелината на подепителния колагенов слой (над 10 μm) и наличие на лимфоцитни инфилтрати [18]. Всичките тези критерии са общоприети и публикувани в различни препоръки и консенсуси по патология от ЕССО и Европейската група по Микроскопски Колит (EMCG) [23].

4.3.5 Ендоскопски изменения при МК

От ендоскопска гледна точка лигавицата на дебелото черво в 50% от случаите е нормална, но останалите 50% може да се установят огнищни „минимални изменения“, като едем, еритем, нарушен съдов рисунък и/или дефекти в мукозата [18][40]. Ендоскопския образ може да варира много между различните пациенти и промените са неспецифични. Развитието на ендоскопската апаратура все повече помага за откриването на МК асоциирани мукозни лезии, които може да не бъдат видяни на по-старите ендоскопски апарати [41]. Характерните ендоскопски изменения може да бъдат следните: хиперваскуларитет, неспецифични изменения в съдовия рисунък по лигавицата (Indistinct vascular pattern), линейарни ерозии/цикатрикси, „котешко одраскване“ (Cat scratch sign), огнищен еритем (Patchy erythema), огнищна лесна контактна ранимост, гранулирана мукозна повърхност и „напукана“ лигавица („Crack-like appearance“) [19][40][42]. Важно предупреждение при тези ендоскопски изменения е, че могат да са налични и при други хронични възпалителни заболявания на червата, което не говори, че те са патогномонични за МК [42].

Ако се използват високотехнологичните ендоскопски изобразителни техники за виртуална хромоендоскопия от типа „narrow band imaging“ (NBI) или „Fujinon Intelligence Color Enhancement“ (FICE) може допълнително да се открият МК-свързани или “МК-специфични“ ендоскопски изменения [42]. Има малко публикувани данни за използването на индигокармин за откриване на ендоскопски изменения при МК [41]. Наличните хромоендоскопски техники може да помогнат за извършване на насочени ендоскопски биопсии за повишаване шанса да се постави диагнозата [41]. Има няколко статии се съобщава поставяне на диагнозата в реално време

чрез използване на конфокална микроскопия [41]. Тази модалност показва доста обещаващи резултати, но сегашната и цена е доста висока и за момента се използва само за изследователски цели [41]. В едно друго проучване е проучена ролята на „high-definition“ (HD+) ендоскопия плюс „i-scan“ [43]. Авторския колектив открива 6 пациента с МК с „мозаичен“ лигавичен ендоскопски образ в 2/2 от случаите с КК и 2/4 в случаите с ЛК [43]. Нарушен съдов рисунок и еритема на лигавицата при 2/2 от пациентите с КК и 2/4 при пациентите с ЛК [43]. Лесна ранимост и линейни ерозии като по типа “cat-scratch” по мукозата са налични при 1/2 и 1/4 от КК и ЛК [43]. Друг важен компонент при тези пациенти е да се биопсират различни сегменти от дебелото черво за да се постави диагнозата [28]. Препоръчително е да се вземат поне две биопсии от всеки сегмент на дебелото черво [28]. Трябва да се внимава с тангенциалното вземане на биопсии за да не се получи „изкуствено“ задебеление на субепителния колагенов слой при подготовката на хистологичния препарат [44]. В едно мултицентрично проучване публикувано през 2017г. от Koulaouzidis et. al. [45] с диагностицирани 607 пациента с МК, макроскопски изменения по хода на дебелото черво се установяват при 108 (17.8%), като за откриването на мукозни изменения (еритема) е имало 87% по-големи шансове, ако ендоскопиите са правени от опитни ендоскописти [45]. Заключение на авторите е, че не-малка част от пациентите с МК имат ендоскопски изменения по хода на дебелото черво и на този етап описанието на тези изменения се базира единствено на опита на ендоскописта и последващи проучвания в тази сфера трябва да бъдат проведени [45].

От обобщените данните на един систематичен обзор публикуван през 2017 от Marlicz [46], с включени 16 проучвания с общо 1582 пациента от

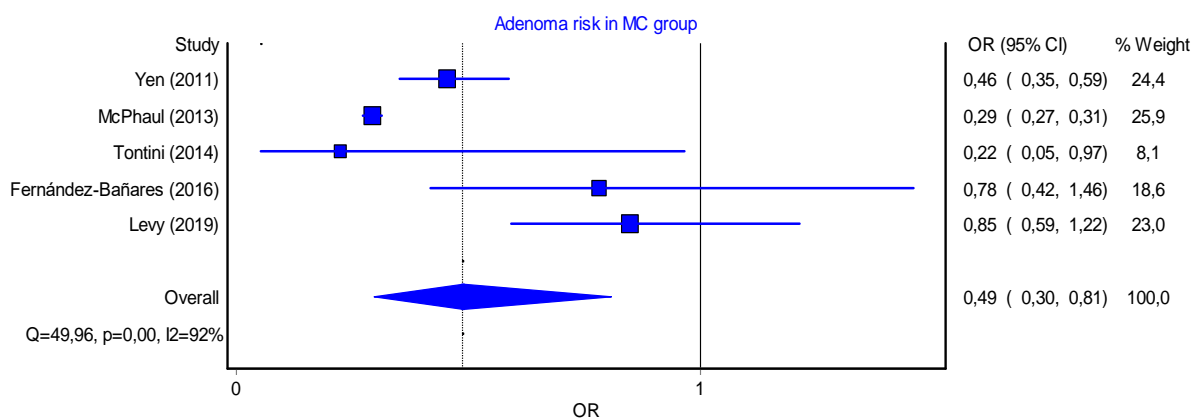
които 615 (38.8%) с МК са с макроскопски изменения по дебелото черво. От тях 608 имат еритема/едем/нодуларност и повърхностни неспецифични алтерации по мукозата на дебелото черво. Локализацията на измененията е описана в левия колон при 11 проучвания, докато в десния колон е описана в 7 проучвания, в трансверзум при 7 проучвания, а в терминалния илеум при 2 от проучвания.

При текущите ендоскопски практики за докладване на аномалии в мукозата на дебелото черво се разчита на локални експертизи на опитни ендоскописти и няма установени стандарти за докладване на тези изменения при МК, което налага бъдещи научни разработки с цел валидиране на различни скориращи системи за ендоскопски изменения при МК [45].

4.3.6 Клиничен ход и риск от колоректален карцином (КРК)

За хроничните възпалителни заболявания на дебелото черво (УК, БК и Глутенова ентеропатия) се смята, че са с повишен риск от развитието на неоплазия. Дългогодишния клиничен ход на МК, традиционно се смята за бенигнен клиничен ход (бенигнено заболяване), който не е добре проучен [47]. Само няколко малки проучвания изучават нормалния ход на заболяването и асоциацията на хроничното заболяване при МК с риска от развитието на КРК. При проведения систематичен обзор се установиха 289 публикации в електронните база от данни MEDLINE и EMBASE по темата МК и риск от КРК. След проведената оценка само 9 пълноправни проучвания са включени в мета-анализа за риска от развитието на КРК при МК, като в по-голямата част от проучванията (3 от тях) има ограничения в ретроспективния им характер, малката кохорта пациенти, кратък период на проследяване и липса на корелацията на тежестта на заболяването с риска за

развитие на КРК (Фигура 5) и (Фигура 6) . При 5 „случай-контрола“ проучвания за МК беше установена асоциация от редуциран риск за развитие на КРК или аденом, сравнен с контролната група (pooled OR 0.65, 95% CI: 0.33-1.28, $I^2=19\%$ и OR 0.49, 95% CI: 0.30-0.81, $I^2=92\%$). Затова финалното заключение на този мета-анализ е, че няма увеличен риск от развитие на КРК при пациентите с МК, докато се наблюдава намален риск от КРК или аденоми на дебелото черво при тези пациенти с МК [37].

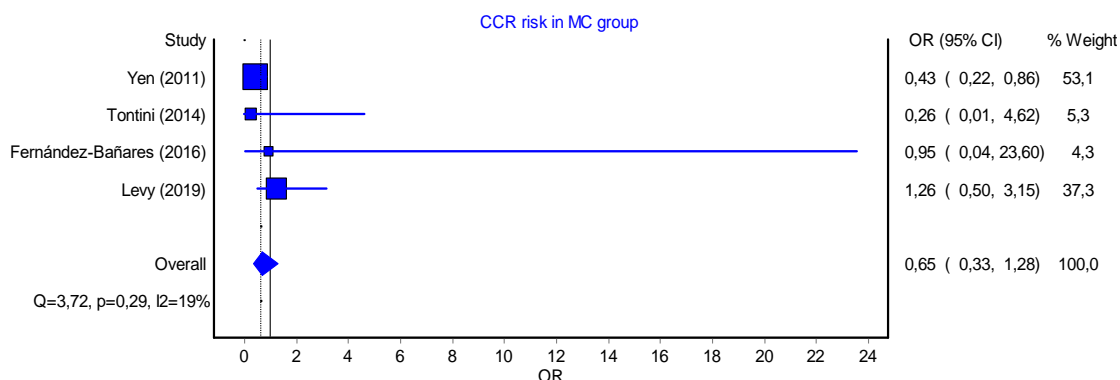


Фигура 5. Обобщен анализ за риска от развитие на аденоми на дебело черво при МК изобразен като Odds Ratio (OR) между МК и контроли*

** I^2 value (statistical heterogeneity) >75% показва голяма вариабилност между проучванията.*

Теоретично може да се спекулира, че хроничната водниста диария има протективен характер в „turn-over“ на клетките на дебелото черво и това се доказва с по-ниската честота на аденоми при МК. Въпреки това, трябва да се има предвид, че заключенията са изведени на базата на оскъдни данни и в бъдеще ще са нужни проспективни продължителни големи кохортни проучвания за проследяване на пациентите с МК [37]. МК не води до

развитие на КРК, но нарушава значително качеството на живот на пациентите и остава фундаментално не-диагностицирано заболяване поради факта от ниска информираност сред здравните специалисти, въпреки налично ефективно лечение, което е на разположение [28].



Фигура 6. Обобщен анализ за риска от развитие на КРК при МК изобразен като Odds Ratio (OR) между MC и контроли*

* I^2 value (statistical heterogeneity) >75% показва голяма вариабилност между проучванията.

4.3.7 Лечение на МК

Будезонид представлява първа линия на лечение за МК и е медикаментът, който значително подобрява качеството на живот на пациентите. Той е локален (топичен) кортикостероид, който бързо се метаболизира в черния дроб и има слаб системен ефект [48][49]. Няколко клинични проучвания са доказали ефективността на пероралния Будезонид 9мг/дн., който дава клиничен отговор от 6 до 8 седмица при пациенти с МК [48][49]. Лечението с Будезонид е препоръчано от европейската група за изучаване на микроскопски колит (EMCG) и консенсуса на американската гастроентерологична асоциация (AGA) за лекарство на избор при пациенти с активно заболяване [25][48][49]. Скоро бях публикувани първите резултати

от Beclomethasone dipropionate за лечение на МК с подобен ефект [50]. В гастроентерологичното общество МК не привлича същия интерес, както другите ХВЗЧ (Болест на Крон и Улцерозен колит) [40], по тази причина знанието за МК сред гастроентеролозите, общопрактикуващите лекари и патолозите трябва да бъде повишено [40].

4.4 Малабсорбция на жлъчни киселини (МЖК)

Хроничната диария вследствие на малабсорбция на жлъчни киселини (МЖК, ВАМ) е често не-диагностицирана патология в нашата клинична практика. Различни диагностични средства са на разположение. Обаче, все още няма установен консенсус кой от тези тестове да се използва за „златен стандарт“, въпреки, че някои автори изказват афинитет за тестовете свързани с нуклеарната медицина (сцинтиграфия) [51].

Хроничната водниста диария е основен симптом при МЖК, но това състояние се среща при много други заболявания и това прави изследваната група пациенти много хетерогенна [52]. МЖК е доказано, че влошава значително качеството на живот на пациентите и предизвиква огромни директни или индиректни медицински загуби [53][54]. Наскоро няколко изследователски групи са се средоточили върху променената абсорбция на жлъчни киселини (ЖК) и реабсорбция, като причината за този тип хронична диария и потенциални „биомаркери“ за МЖК [53].

4.4.1 Класификация на МЖК

Според различните етиологични фактори, които увреждат тънкото и дебелото черво, МЖК се разделя на 4-ри основни типа и от това зависи патогенезата на заболяването [53][54].

Тип 1 – Дисфункция на терминалния илеум, което води до нарушение на реабсорбцията на ЖК (Болест на Крон, резекция на терминалния илеум и радиационен илеит) [54].

Тип 2 – Първична МЖК, асоциирана с увеличено количество ЖК в червата и още наречена „идиопатична“, като често присъства при заболявания свързани с функционалните чревни заболявания или IBS-D [54].

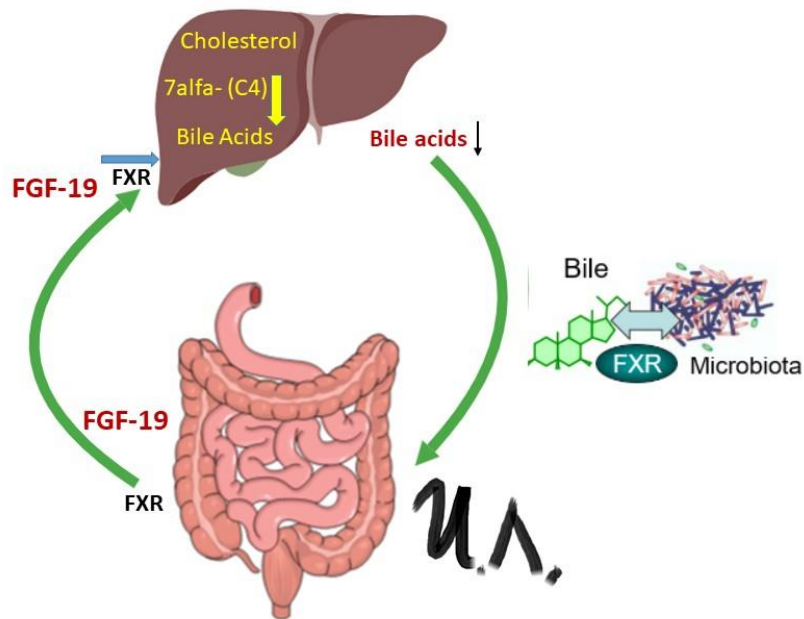
Тип 3 – Може да бъде диагностицирана при пациенти с нормално функциониращ терминален илеум и нормална реабсорбция на ЖК, но съществуват подлежащи заболявания довеждащи до МЖК като например: хроничен панкреатит, глутенова ентеропатия, пост-холецистектомия и микроскопски колит (МК) [54].

Тип 4 – Представява увеличено количество на ЖК синтезирани в черния дроб и достигнали до дебелото черво. Това е нова категория в която влизат пациенти приемащи метформин или имат хипертриглицеридемия, без да имат явен източник на увреждането на реабсорбцията на ентеро-хепаталния кръговрат на ЖК [53][54].

4.4.2 Патофизиология на ЖК

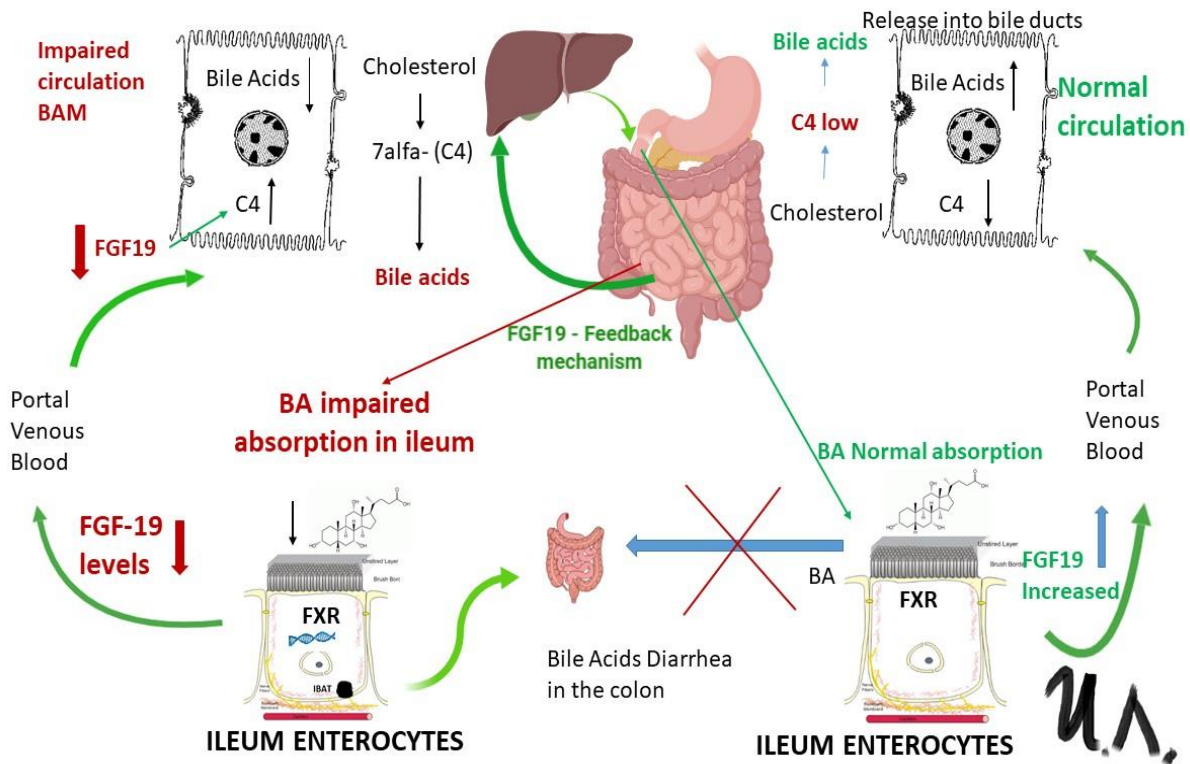
Продукцията на жлъчните киселини изисква серия от сложни стъпки [55][56]. Те се синтезират в черния дроб от холестерол, което е първата стъпка. Продуцираната холева и хенодезоксихолева киселина (първични) се метаболизират от 7-алфа-хидроксилазата (CYP7A1). Първичните жлъчни киселини се трансформират в червата на човека от наличните бактерии във вторични жлъчни киселини – литохолева и дезоксихолева киселина. Те се свързват с ентероцитите в терминалния илеум чрез апикален натриев-зависим жлъчен транспортер (ASBT), който пренася ЖК до черния дроб.

При това свързване се стимулира ядрения farsenoid X receptor (FXR) рецептор, който играе главна роля в ядрените ЖК рецептори и продуцира „илеалния хормон“ от ентероцитите наречен Fibroblastic growth factor 19 (FGF19), който пътува през порталната циркулация до черния дроб и в черния дроб предизвиква негативна ихибираща функция на 7 α -hydroxylase и инхибира лимитиращия ензим 7- α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) [57]. C4 е много важен ензим регулиращ продукцията на ЖК чрез контрол на синтеза на холестерол 7-hydroxylase (CYP7A1) [54][57](Фигура 7). Генетични мутации са описани на ASBT, който помага на ЖК да осъществят транспорта през ентеро-хепаталния кръговрат, което може да е една от причините за МЖ [53][54]



Фигура 7. Ентерохепаталния кръговрат и ролята на FXR рецептора и FGF-19 в регулацията на синтеза на жлъчни киселини

При нормални условия 5-10% от жлъчните киселини са елиминирани през червата, като оставащите 95% от ЖК се реабсорбират и този цикъл се повтаря 4-6 пъти на ден. Когато този цикъл се наруши се установява МЖК и се повишава концентрацията на ЖК в дебелото черво, които не са абсорбирани в тънкото, а това довежда до стимулирано отделяне на вода в лумена на червото и секреция на електролити, което засилва моториката и предизвиква тежка водниста диария [53][54]. Подробна патогенеза на целия патологичен цикъл на МЖК е отразен на (Фигура 8).



Фигура 8. Подробен патофизиологичен цикъл на МЖК

4.4.3 Честота и разпространение на МЖК сред населението

МЖК е често разпространена и много малко разпозната причина за хронична диария. От 20% до 50% от пациентите с хронична диария от

функционален характер (IBS-D и др.) имат състояние на МЖК [58]. Това се случва при структурно здрав терминален илеум (IBS-D) и е класически пример за МЖК тип 2 [51][52]. Честота на МЖК сред пациентите с БК е 30%, като над >50% се среща при радиационен ентерит и почти 90% от пациентите след резекция на терминалния илеум имат МЖК [59]. МЖК е често асоциирана с МК (10-60%) и пост-холецистектомираните пациенти с диария, като представители на тип 3 МЖК [28]. Ruiz-Campos и сътрудници публикуват мета-анализ (2018г.) от 8 включени проучвания с n=361 пациента след холецистектомия, честота на МЖК е 70% (95% CI 56%-82%) сред изследваните пациенти с хронична диария и отговора на холестирамин е много добър при тази група пациенти [58]. Нужни са още по-големи проспективни проучвания за да се установи честотата на МЖК при други групи пациенти с хронична диария.

4.4.4 Диагностични тестове за малабсорбция на жлъчни киселини

Човешкият гастроинтестинален тракт е комплексна и много динамична система в която участват предаването на сигнали между имунната система, нутригенти и микробиома в червата. Мрежа от регулаторни гени свързва всички тези инфламаторни клетки, сигнали и същевременно осигурява хомеостаза и имунен баланс между лигавицата и луминалните агенти [5]. Изучаването на тези сложни пътища на предаване на сигналите и молекулите, които участват в тази регулация на имунната система в червата ще даде тласък на развитието и прицелното „таргетно“ лечение на пациенти с хронична диария и най-вече на пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) [60].

4.4.5 Фарнезоид X рецептор (FXR)

Ядрените рецептори (NRs) са увеличаваща се фамилия от регулаторни фактори между хранителния метаболизъм и вродената имунна система [61]. Един такъв рецептор е ядреният фарнезоид X рецептор (FXR), който се активира от ЖК и има основно значение в патогенезата на МЖК. FXR има отношение към чревното възпаление и метаболизма на черния дроб и червата, защото се експресира в черния дроб и червата [60][61].

FXR директно повлиява механизма на ентéroхепатален кръговрат на жлъчните киселини и има директен ефект върху секрецията на жлъчка от хепатоцита, като представлява един медиатор на връзката между черния дроб и червата [62]. Ролята на FXR е доказана при различни експерименти с мишки и хора, като биопсични проби взети от техните черва показват, че се установява ниска експресия на този рецептор при пациенти с хронична диария, най-вече тези с болест на Крон, МК и IBS-D [60][61][62]. Този рецептор е обект на лечение на нов вид медикаменти наречени FXR агонисти, които регулират механизма на секреция на жлъчните киселини и най-вече предотвратят симптомите на тези пациенти [63]. В момента се правят проучвания, които изследват тази експресия върху пациенти с IBD с цел FXR да се превърне в бъдеща терапевтична цел [64].

FXR играе ключова роля в бариерната функция на червата и бактериалната транслокация, което се смята, че е ключов елемент на хроничната диария при микроскопски колит, БК и УК [65]. Директната модулация на този рецептор посредством FXR агонисти ще доведе до обещаващ напредък при този вид заболявания [65].

4.4.6 ^{14}C -glycocholate: Дихателен тест

При този тест се приема радиоактивна маркирана жлъчна сол ^{14}C -glycocholate. Glycocholate се превръща в ^{14}C -глицин, благодарение на бактериите в тънките черва, който глицин е абсорбиран, включен в ентерохепаталния кръговрат и след това метаболизиран в черния дроб до $^{14}\text{CO}_2$, който е измерен чрез дихателен тест. За целта обаче, трябва да се измери и количеството на отделяните фекални маси и количеството на фекалните жлъчни киселини. Този тест не може да разграничи SIBO или други болести имащи отношение към терминалния илеум (БК или резекция) [55][66]. Количеството отделено CO_2 през първите 2-4 часа не показва добре корелация с реалната МЖК в дебело черво, дори и на 180 минута от теста. Това е причина, този тест вече да не се използва, както и негово радиационно натоварване [55][66].

4.4.7 Емпиричен тест с хелатори на жлъчни киселини

Този „диагностичен тест“ представлява приемането на доза от хелатори на жлъчните киселини (холестирамин), и ако пациентът се подобри след това, този тест се смята за позитивен. Този подход е доста противоречив, стар и се базира само на мнението на определени специалисти, които нямат достъп до други диагностични тестове на МЖК. Негативните резултати от този тест не отхвърлят подлежаща МЖК [58][67].

4.4.8 $^{75}\text{SeHCAT}$ - $^{75}\text{Selenium homotaurocholic acid test}$

Този тест се провежда в специализирано звено по нуклеарна медицина, като се изисква специализирана апаратура и маркиран ^{75}Se селениум, който е радиоактивен (370 Kbpq). $^{75}\text{SeHCAT}$ е образен метод (сцинтиграфия), който изобразява реабсорбцията на ЖК и тяхната задръжка в организма.

Пациентът поглъща капсула с маркираните ЖК, след това на гама-камера на 3-тия час се установява основната концентрация (baseline). Седем дни след приема на капсулата, пациентите идва отново за повторно измерване за да се определи колко маркираните радиоактивни ЖК са останали в човешкия организъм (черния дроб и жлъчното дърво) и колко са попаднали в червата. Пациентите с намалена задръжка (<15%) на маркирани ЖК се смятат, че имат загуба на ЖК в дебелото черво, което е признак за МЖК [66][68][69][70]. Препоръчително е да се спре всякакво лечение с хелатори на ЖК, жлъчегонни медикаменти или анти-диарични медикаменти, за да е по-точен теста [66][68][69]. Референтни граници (cut-offs) на ⁷⁵SeHCAT са <5% ЖК ретенция (задръжка) – много тежка МЖК, <10% ретенция на ЖК – среднотежка МЖК и под <15% ретенция на ЖК – средно тежка МЖК. Тези три степени са условни, като повечето автори приемат стойности за <10% за сигнификантна МЖК [66][71][68]. Чувствителността на теста варира в граници от 59.6% до 100% (средно 87.32%) и специфичността варира от 80% до 100% (средно 93.2%), но трябва да се има предвид, че тези публикувани данни от проучванията са много стари и са правени при доста хетерогенна популация [66][71][68].

⁷⁵SeHCAT има няколко предимства: 1) Висока чувствителност и специфичност за МЖК; 2) Определя функцията на терминалния илеум; 3) Може да определи функцията на черния дроб свързана с ЖК; 4) Определя цялото количество на задържани ЖК [66][71][68]. Основните недостатъци на ⁷⁵SeHCAT са: 1) Не може да се ползва в педиатрията; 2) Радиационно натоварване; 3) Трябва два пъти да идва пациента за определяне на теста; 4) Изисква нуклеарна медицина за провеждането; 5) Скъп тест, който не е на разположение в повече страни от Европа и САЩ [66][71][68].

4.4.9 Серумен Fibroblastic growth factor 19 (FGF-19)

При пациенти с тип 1 МЖК (БК) е доказано, че се установява намалена реабсорбция на ЖК поради намалена продукция на FGF-19 и увеличена секция на серумен С4 [72]. Същите механизми се установяват и при другите типове МЖК. Ролята на FGF-19 е да регулира ентеро-хепаталния кръговрат, като повече ЖК се окажат в дебелото черво, той е в по-ниска концентрация в серума, а С4 е в по-висока и това довежда до инхибицията на синтеза на ЖК в черния дроб (**Фигура 8**). Взимайки предвид тези патофизиологични механизми, определянето на серумен FGF-19 може да има голяма полза в поставянето на диагнозата МЖК и отговора от лечението с хелатори на ЖК. Чувствителността на теста при референтна стойност от $<145\text{pg/mL}$., варира от 50% - 80% (средно 63.8%) и специфичността варира от 65% - 79% (средно 72.3%) [72][73][74][75]. Основното предимство на теста е, че определя МЖК при еднократно вземане на кръв. Тестът е лесен, бърз, евтин (използва се ELISA) и не изисква затруднения в отчитането. Основните недостатъци са, че е с по-ниска чувствителност и специфичност, има дневни вариации и трябва да се изпълнява винаги на гладно, защото се влияе от приема на храна (секреция на ЖК) [76][77]. Вогур и сътрудници предлагат стимулиране с различни хелатори преди вземането на пробата кръв за да се повиши диагностичната му точност [75]. В крайна сметка, този метод е най-често използвания „биомаркер“, поради лесната му употреба и изпълнение, но трябва да се има предвид, че той поставя диагнозата на базата на индиректна връзка установена в ентеро-хепаталния кръговрат [73].

4.4.10 Серумен 7- α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4)

Тестът C4 е субстрат участващ в синтеза на жлъчните киселини от холестерол и регулира CYP7A1 (**Фигура 8**). C4 може да бъде измерен в серума. Неговата концентрация също зависи от циркадните ритми и концентрацията му е право пропорционална на продукцията на жлъчни киселини. При пациенти с МЖК, стойностите на C4 ще са високи и ще отразяват увеличената продукция на жлъчни киселини [51][55][58]. При сравнителни проучвания с $^{75}\text{SeHCAT}$, референтните стойности на C4 при “cut-off” $>48.3 \text{ ng/mL}$, представят чувствителност в рамките на 74% - 97% (ср. 85.2%) и специфичност от 53% - 94% (ср. 71.1%), както и негативна предсказваща стойност (NPV) от 98% и позитивна предсказваща стойност (PPV) от 74% [78]. При тези тестове винаги се запазва обратната зависимост с нисък FGF-19 и висок C4 при диагнозата МЖК [66]. C4 се измерва посредством „high-performance liquid chromatography“ (HPLC) със „mass spectrometry“ [77][79][80][72]. Основните предимства на C4 е, че се нуждае само една единствена проба от серума, има висока NPV, няма излагане на радиация и има висока чувствителност. Недостатъците на теста са свързани с това, че пациентът не трябва да има подлежащо чернодробно заболяване и не трябва да е получавал статини през последните 2 седмици. Друг голям недостатък е, че трябва да имате нужната скъпа апаратура HPLC с обучен персонал за да бъде осъществен теста [72][77][79][80].

4.4.11 Общи и индивидуални жлъчни киселини във фецес за определяне на МЖК

Секретираните във фецеса ЖК ускоряват секрецията на вода и електролити в дебелото черво и увеличават моториката на червото [66][54].

Измерването на фекалните ЖК е директен метод за определяне на ексцесивните ЖК, които присъстват при МЖК в дебелото черво. Проведени са различни тестове при предходни проучвания в които се установява, че има голяма корелация между общите жлъчни киселини във фецес със $^{75}\text{SeHCAT}$ [81]. Измерването на тоталните свободни фекални ЖК при референтни стойности над $>2,337\mu\text{mol}/48\text{h.}$, говори за МЖК [81]. Първичните жлъчни киселини (холева и хенодезоксихолева) са сигнификантно повишени при пациенти с МЖК и корелират с консистенцията и честотата на изхожданията [66][79][80]. Поради факта, че не навсякъде се използва $^{75}\text{SeHCAT}$, този метод на определяне на МЖК е бил един от първите за поставяне на диагнозата [81]. При стойност от $>2,337\mu\text{mol}/48$ часа, чувствителността му варира от 49% - 76% (средно 66.6%) и специфичността варира от 75% - 91% (средно 79.3%) за диагностициране на МЖК [77][81]. Увеличените първични фекални ЖК с реф. граница $>1,000\mu\text{mol}/48\text{h.}$, имат подобна диагностична точност ($p = 0.13$) като тоталните (общите) фекални ЖК за откриване на МЖК. При увеличаването на “cut-off” до 10% не се променя чувствителността и специфичността на теста [81]. При анализ от 986 пациента с хронична диария, които са подложени на 48ч. събиране на фекални ЖК, при 26% от пациентите се установява завишени тотални (общо) фекални киселини, където 46% от пациентите има завишени първични ЖК $>10\%$, което показва, че изследването само на тоталните (общите) не е достатъчно за поставяне на диагнозата МЖК [81]. Предимствата на този метод са в това, че той е неинвазивен, директно измерва концентрацията на ЖК, но има недостатъци в това, че пациентите трудно събират цялото количество от 48 часа фецес и не всяка лаборатория е склонна да прави това измерване [82]. Самото събиране

за период от 48ч. много сериозно поставя под въпрос съдействието на пациента в изследването. Определянето на жлъчните киселини във фецес може да стане чрез ELISA, но по-точен тест е HPLC [77][81][83]. Проведени са различни проучвания при еднократно измерване от фецес, за да се сравни диагностичната точност на този тест за МЖК, но за момента резултатите са неубедителни [84].

4.4.12 Серумно измерване на тотални (общи) и индивидуални жлъчни киселини

При здрави индивиди, серумното определяне на тоталните (общи) и индивидуалните жлъчни киселини представлява репрезентация на „рециклираните“ ЖК, които са реабсорбирани в илеума. Около 50% от новосинтезираните са съхранени в жлъчния мехур. Оставащите ЖК са секретирани в дуоденума и основната цел на това изследване в определяне на серумните жлъчни киселини има при холестатични чернодробни заболявания, билиарна обструкция и най-вече при интрахепатална холестаза по време на бременност [66][54]. При всичките проучвания не е установена корелация между $^{75}\text{SeHCAT}$ и серумните жлъчни киселини за определяне на МЖК и няма данни да имат полза в установяването на диагнозата при пациенти с хронична диария [28][78].

4.4.13 Лечение на МЖК

Лечението на МЖК най-често включва диета и медикаментозно лечение. По-голямата част от проучванията са фокусирани върху лечението с хелатори на жлъчните киселини (BAS), като най-тестван медикамент е холестирамин. От публикувания мета-анализ на Wilcox и сътрудници, холестирамин е ефективно средство при по-голямата част от пациентите в

различните проучвания [85]. Обаче, лечението с холестирамин при тежките форми на БАМ, понякога е обречено на неуспех, поради многото странични ефекти на лекарството [86]. Холестирамин и холестипол са най-често използваните и са под форма на прахчета или гранули, които да се смесват с вода. Холестирамина има много по-лош вкус и трудно се приема от пациентите. Някои автори смятат, че холестипол е по-добре толериран от пациентите и това ще подобри повече съдействието от страна на пациента [86]. Холесевелам е нов хелатор, който е наличен в таблетна форма и образува полимерен гел в гастроинтестиналния тракт. Това му свойство помага значително пред другите два медикамента и се смята, че образува много по-добра покривка по лигавицата на червата. Композицията на хелаторите е такава, че те свързват наличните хидрофобни жлъчни киселини (хенодезоксихолева и деоксихолева в червата) [86]. Холесевелам свързва и хидрофилната холева киселина, което му дава известно предимство пред другите BAS за лечение на МЖК. При много пациенти, които не са отговорили на лечение с холестирамин, са успешно лекувани с холесевелам и 57% от тях са на дългосрочно лечение с този медикамент без тежки странични ефекти [67]. Нужни са по-големи проучвания, за да се види ефекта в дългосрочен план и да се види дали холесевелам има по-добър ефект от холестирамин или холестипол, като първа линия на лечение на МЖК. За момента холестирамин е първа линия на лечение и цената на трите медикамента е висока, като при високите дози е еднаква и при трите медикамента. Хелаторите на ЖК имат способността да намаляват абсорбцията на много други медикаменти (варфарин, сиинтром, дигоксин, диуретици и бета-блокери) и мастно-разтворимите витамини. Трябва да се

внимава при приема на тези медикаменти и да се спазва бионаличността, като се приемат поне 4-6 часа между хелаторите [86].

Друг тип не-хелаторна терапия е използването на алуминиум хидрооксид, който съдържа свойства да облекчава симптомите на МЖК, но не е добре проучен в момента [86]. Той най-често се използва при диспепсия и рефлукс-езофагит, но рядко се предписва за МЖК [86].

Наскоро откритите FXR рецептор и FGF-19 представят обект на атакуване от наличния FXR-агонист „Обетихолева к-на“ (OCA), която се свързва с рецептора и прекъсва механизма на диарията, което е доказано в няколко скорошни проучвания [79]. Нужни са проспективни проучвания при пациенти с МЖК и сравнение на “head-to-head” наличните BAS, за да се види тяхната ефективност и да се установи стандартен подход за лечението на тези пациенти с хронична диария дължаща се на МЖК.

4.5 Еозинофили в гастроинтестиналния тракт (ГИТ)

Еозинофилите (Ео) са проинфламаторни левкоцити, които съставляват 1-5% процента от циркулиращите кръвни клетки. При здрави индивиди, повечето от тези клетки са локализирани в гастроинтестиналния тракт и по-точно в ламина проприя на стомаха и червата. Тези клетки се диференцират в костният мозък от прогениторни клетки под влиянието на интерлевкин (IL-3, IL-5 и гранулоцит-макрофаг колониален растежен фактор. IL-5 стимулира Ео да излязат от костния мозък и да преминат в периферната кръв [87]. Еозинофилите са налични при всички възпалителни състояния в организма и персистират с дни и седмици, дори от месеци до години.

Еозинофилите секретират токсични възпалителни медиатори, които са съхранени в техните везикули (гранули) и се синтезират *de novo* след

целуларна активация. Основният протеин секретиран от еозинофилите се нарича “eosinophilic cationic protein”, други автори го наричат „eosinophil protein x”, а по-късно обобщен като финален термин “eosinophil derived neurotoxin/ eosinophil protein x (EDN/EPX)”. Съществен компонент е наличието на еозинофилна пероксидаза в тези везикули, която оказва увреждане на клетки и тъкани, преминава през пори и мембрани, и увеличава гладкомускулната реактивност чрез генериране на кислородни радикали [87].

Еозинофилите и техните гранули са увеличени по брой при много гастроинтестинални заболявания, като се установяват в мукозата при рефлукс-езофагит, автоимунен гастрит, лекарствени взаимодействия, ХВЗЧ, колагенози, радиационен ентерит, неоплазма и паразитологични заболявания. Повечето от тези състояния показват смесен характер на клетъчна инфилтрация, като неутрофили, лимфоцити и други възпалителни клетки. Наличието на стряскащо увеличен брой Ео в мукозата много често създава диференциално диагностични въпроси и замаскира основното заболяване, като понякога се обсъжда и заболяване като еозинофилен гастроентерит, ако в лигавицата се открива изобилие от еозинофили.

4.5.1 Ролята на еозинофилите и хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ)

В сферата на възпалителните чревни заболявания на червата (ХВЗЧ, IBD) все повече започва да се обсъжда ролята на еозинофилите като фактори на възпалението [88]. Възпалителния процес при ХВЗЧ обхваща много възпалителни клетки, като неутрофили, лимфоцити, макрофаги, мастоцити и еозинофили [89]. Двете най-важни роли които Ео имат в патогенезата на IBD

са като про-инфламаторни и про-мотилитетни агенти, които засилват ефекта при диаричните изхождания, възпалението, разрушението на клетките, формирането на фиброза и образуването на стриктурите [87]. Акумулацията на еозинофилите в ГИТ и регулацията от различните регулаторни молекули ангажирани в патогенезата на IBD не е още добре проучена. Filippone et al., докладва в една статия от март 2019, че еозинофилите предизвикват хронично възпалително увреждане на чревната нервна система (ENS), което е асоциирано с тежестта на чревното възпаление. Този патогенетичен механизъм не е напълно проучен при пациентите с IBD [88]. Дегранулацията на левкоцитите е била широко проучвана при предходни наблюдателни проучвания при IBD пациенти [87]. Въпреки, че катионите гранули на еозинофилите играят защитна роля при различна паразитна инвазия, при IBD пациентите е доказано повишеното ниво на еозинофили в лигавицата, които активират други имунни клетки и така усложняват заболяването. Интестиналното възпаление променя ентералната нервна система и гладките мускули на дебелото черво и значително повлиява мотилитета при IBD пациентите [88].

4.5.2 Eosinophil-derived Neurotoxin/Eosinophil protein x (EDN/EPX)

EDN има невротоксичен ефект, който акумулира и предизвиква невропатия и аксонално увреждане. Невротоксичният ефект за първи път е установен през 1932 и наречен “Gordon’s phenomenon”, когато той за първи път екстрахира еозинофилния катионен протеин (по-късно наречен EDN) [90]. При експериментални модели на мишки и прасета, когато се инжектира EDN в червата, се установяват сериозни увреждания на ENS, което е съпроводено с обилна инфилтрация от еозинофили [88]. При пациенти с IBD

концентрацията на EDN може да стигне до 538 ng/mL, сравнение с 163 ng/ml в червата на контролни пациенти, което е доказателство за възпалителния отговор. При деца са установени високи нива в серум и фецес на EDN/EPX при IBD пациенти, които стойности корелират с активността на заболяването [91].

4.5.3 Фекалните маркери при IBD и МК

Фекалните биомаркери имат обещаващо предназначение да откриват чревно възпаление при IBD пациенти [92][93][94][95]. Неутрофилният протеин, наречен фекален калпротектин (ФКП) и EDN/EPX са установени като маркери на интестиналното възпаление при УК и БК в редица проучвания [92][93][95]. В скорошно проучване от Wagner et al., демонстрира, че повишените нива на EPX могат да предскажат изхода от лечението на МК с хронична водниста диария [93]. Това дава възможност да се покаже как биомаркерите могат да намерят приложение в ежедневноста ни практика за диагностициране и мониториране на IBS-D, IBD и МК [94]. Повечето предходни проучвания, които изучават ролята на ФКП за диференциация на IBD от функционалните заболявания на червата (IBS-D) установяват добра специфичност, добра корелация с ендоскопската находка и активност спрямо IBS-D пациентите [96][95][97]. Друго проучване установява ролята на фекалните маркери за разграничаване на МК от IBS-D пациентите с хронична водниста диария, като открива, че ФКП е леко завишен в групата с МК, както и EDN/EPX [98][93]. Въпреки това, все още не може да се смята ФКП за маркер на „органично“ заболяване, поради факта, че е маркер на неутрофилно чревно възпаление, което се среща и при други болестни състояния. Има пациенти с БК, които са със засягане на

терминалния илеум и са с нормални или леко завишени стойности на ФКП, което допълнително затруднява диагностиката [93][96][94]. Това от своя страна е добра отправна точка да се търсят и други биомаркери за чревно възпаление, които допълнително да улеснят диагностично-терапевтичния процес при IBD пациентите.

4.6 Сравнение на диагностичната точност на различните биомаркери

Биомаркерите са молекулни, хистологични, радиологични или психологични характеристики, които показват нормален или патологичен биологичен процес, както и отговор на дадена терапевтична интервенция. Биомаркерите измерват дадена биологична субстанция, структура или процес, който повлиява или предсказва даден резултат. Някои биомаркери служат като маркери за определяне на тежестта на дадено заболяване или като краен резултат от лечение [99]. Кръвни и фекални биомаркери са предпочитаните биологични проби за измерване, защото са лесни за вземане и може да се изследват многократно. В повечето случаи се използват комбинирани панели от биомаркери, за да се оптимизира и увеличи диагностичната чувствителност или да се постави (насочи) диагноза към дадено състояние. Диагностичната точност на всеки биомаркер може да се определи, като се изследва неговата чувствителност, специфичност, позитивна и негативна предсказваща стойност за откриване на определено състояние [99].

4.6.1 Биомаркери за малабсорбция на жлъчни киселини (сравнителна характеристика)

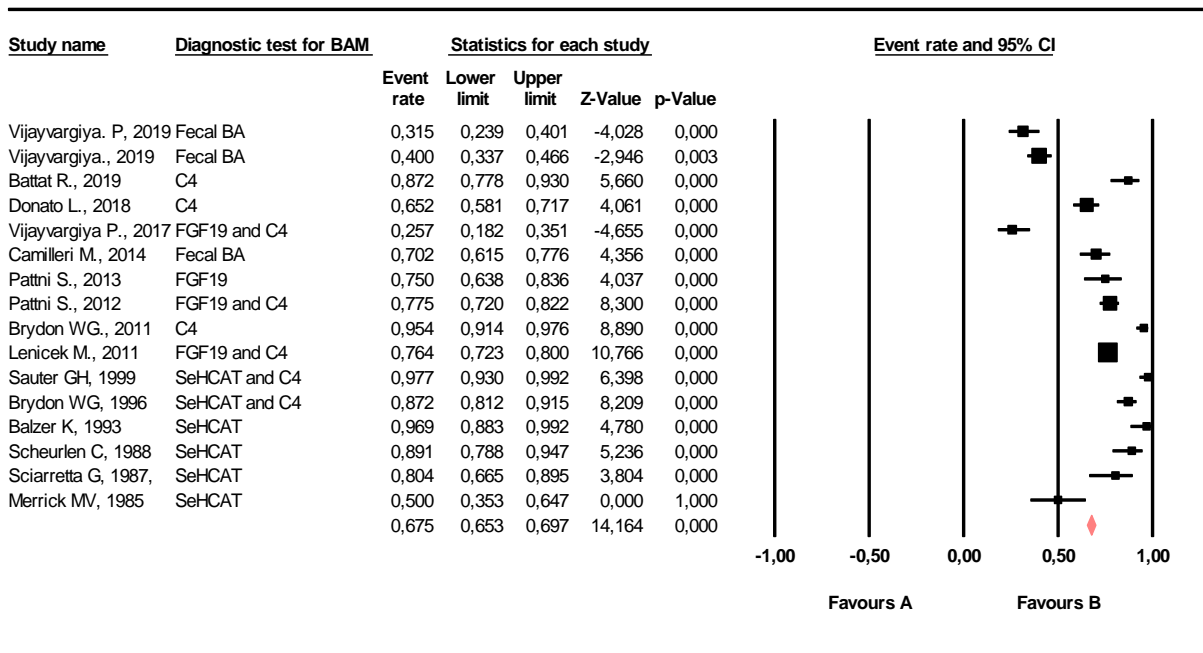
На (Таблица 4-2) са изобразени различните методи за диагностика на МЖК и обобщено представени резултатите от различните тестове с техните силни и слаби страни. Резултатите са обобщени на базата на серия публикуваните проучвания и данни представени от систематични обзори и мета-анализи [51][58][68][74][100].

Диагностичен тест	⁷⁵ SeHCAT [101]	Серумен C4 [59] [102]	Серумен FGF-19 [64]	Фекални жлъчни к-ни [81]	FXR експресия [62]
Какво измерва теста	Илеалния капацитет за реабсорбция на ЖК и тяхната ретенция след 7 дни	Синтез на жлъчни киселини в черния дроб	Илеален хормон отговорен за обратна връзка (инхибиция) на ЖК	Общо количество ЖК екскретирано в дебелото черво.	Измерване на експресията на FXR рецептура в лигавицата на дебело черво
Cut-off (референтни граници)	<5% - тежка <10% - средно тежка <15% лека степен на МЖК	>48.3 ng/mL	≤145 pg/mL	Тотални над >2,337 μmol/48h., Първични >1,000 μmol/48h	Няма установени. Сравнява се спрямо здрава контрола
Чувствителност, (mean)	87.32%	85.2%	63.8%	66.6%	Няма данни
Специфичност, (mean)	93.2%,	71.1%	72.3%	79.3%	Няма данни
Метод на изпълнение	Маркиран ⁷⁵ -Селен и Гама-камера	HPLC Преди 9:00ч.	ELISA	HPLC	Биопсия от дебело черво и RNA later + Експресия на РНК
Силни страни	Висока диагностична точност	Еднократна кръвна проба	Еднократна проба, лесен, бърз и евтин	Директно измерване на ЖК във фецес	Много точен маркер за броя на рецептори в лигавицата на дебело черво.
Слаби страни [66] [74]	Радиоактивно натоварване, скъп, 0 и 7 ден проверка и го няма в повечето държави.	Изисква скъпа апаратура и обучен персонал. Вариабилност през деня.	Има вариабилност през деня. Трябва да се мери преди 9:00ч.	Изисква 100г диета с мазнини и 48ч. събиране на фецес от пациента, което затруднява пациента. Няма лаборатория.	Няма установени референтни граници малко проучвания

Таблица 4-2. Сравнителна характеристика на всички методи за МЖК

4.6.2 Мета-анализ на диагностичната приложимост (Diagnostic yield) на различните методи за доказване МЖК спрямо чревното възпаление

На (Фигура 9) е представен „Forest plot” анализ на 16 проучвания разглеждащи диагностичната стойност на различни диагностични тестове за МЖК. Мета-анализът е проведен чрез определяне на Event rate (пациентите диагностицирани като true positive) във всяко проучване от общия брой пациенти. Определяне на честотата на позитивните пациенти и определяне на статистическа разлика между тях е със средна стойност от 0.675, което е 67.5% диагностицирани с МЖК от цялата кохорта от n=2332 случая ($p < 0.001$) [103].

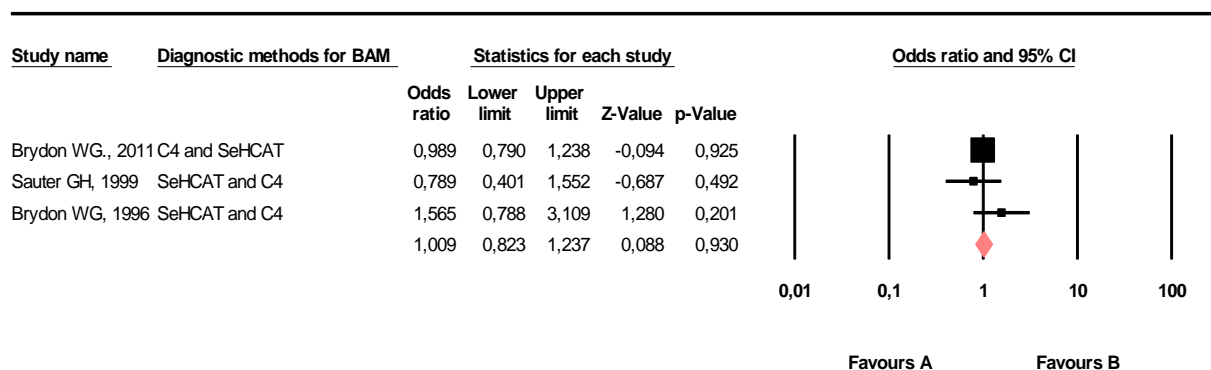


Meta Analysis

Фигура 9. Мета-анализ на 16 проучвания изследващи чувствителност и специфичност на различните тестове за МЖК. Мета-анализът определя true positive cases (events rate) в тези проучвания и дава $p < 0.001$ [103].

Сравнителен метаанализ между проучванията едновременно изследващи С4 и SeHCAT маркери за МЖК е представен на (Фигура 10) [103].

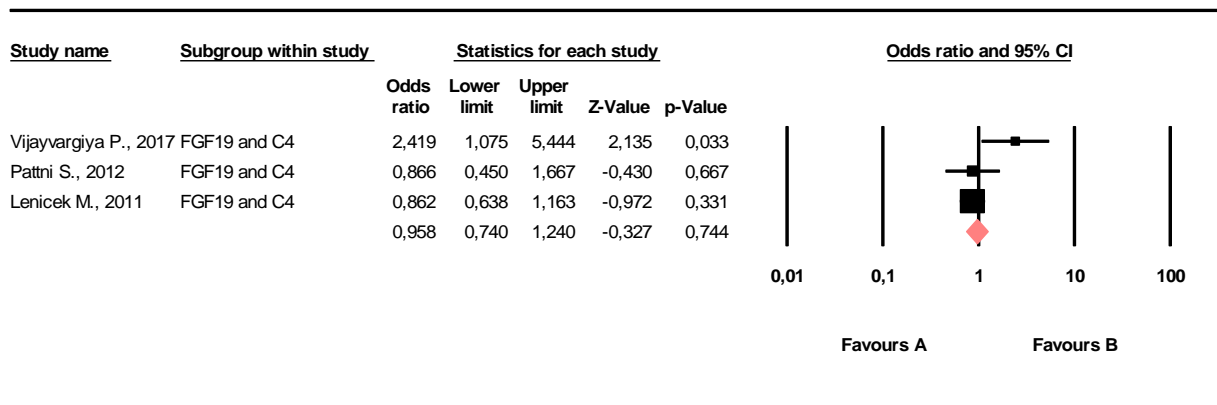
При изследваните „Odds ratio“ между различните проучвания сравняващи С4 и SeHCAT няма статистическа разлика в броя на „true positive“ случаи на МЖК, което е индиректен белег за еднаква диагностична ефективност на изследваните показатели ($p = 0.930$) (Фигура 10).



Meta Analysis

Фигура 10. Мета-Анализ на 3 проучвания сравняващи едновременно С4 и SeHCAT с изобразен Odds Ratio ($p = 0.930$).

При осъществяване на мета-анализ на проучванията изследващи “head-to-head” FGF-19 и С4 се установява, че няма статистическа разлика в Odds ratio между „true positive” пациентите с FGF-19 и С4 ($p=0.744$) (Фигура 11). Това говори за приблизително еднаква диагностична точност при тези два теста за диагностициране на МЖК [103].



Meta Analysis

Фигура 11. Мета-анализ за Odds Ratio за МЖК между FGF-19 и C4

От проведените мета-анализи става ясно, че няма „златен стандарт“ за диагностициране на МЖК поради почти еднаквите Odds Ratio на различните тестове за МЖК [103]. Това дава възможност да се разработват все повече серумни и фекални биомаркери за МЖК и SeHCAT все по-рядко се използва в клиничната практика, поради своята трудоемкост [55]. Биомаркерите много по-лесно ще насочат лекарите към правилния терапевтичен подход за МЖК [103].

На (Таблица 4-3) са представени сравнителни характеристики на най-често използваните фекални биомаркери за определяне на чревно възпаление с отдиференциране на чревното възпаление от МЖК. За определяне на степента на МЖК е важно да се определи статуса на чревното възпаление [103]. Трябва да се има предвид, че представените данни са на базата на няколко сравнителни проучвания, поради факта, че няма много данни в литературата за сравнение “head-to-head”, на различните биомаркери за чревно възпаление. Някои от маркерите, като F-EPX не са добре проучени и тяхното приложение тепърва, може да се сравнява срещу установения вече златен стандарт ФКП [6][104].

4.6.3 Сравнение на фекални биомаркери за чревно възпаление

Диагностичен тест	F-EPX	FCP	FMPO
Какво измерва?	Основният протеин секретиран от Eo се нарича “eosinophilic cationic protein”	Калциев свързващ протеин инхибиращ металопротеиназите и показващ неутрофилната активност	Миелопероксидазата в неутрофилите и тяхната активност
Cut-offs	<366 ng/mL	<50 µg/g	<2000 ng/g
Чувствителност, (mean)	88.46%	90.77%	84.62%
Специфичност, (mean)	84.47%;	85.42%	51.16%
Метод на изпълнение	ELISA	ELISA	ELISA
Силни страни	F-EPX при активен УК е с Много висока диагностична точност при активна болест на ХВЗЧ заболяване.	Установен златен стандарт за IBD	Евтин, лесен, маркер за бърз отговор на лечение
Слаби страни	Има голяма дневна вариабилност. Не е проучен достатъчно.	Влияе се от много други фактори на възпалението.	Ниска чувствителност и PPV, NPPV

Таблица 4-3. Сравнителна характеристика на фекалните маркери за чревно възпаление [93][105][106][7][6][104].

4.7 Хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ, IBD) в ремисия и необяснима хронична персистираща диария

Хронични възпалителните чревни заболявания (ХВЧЗ) са голяма нозологична единица включваща в себе си болестта на Крон (БК), улцерозният колит (УК), некласифицируемия колит (НК) и някои автори причисляват и микроскопския колит към тази група. ХВЧЗ се характеризират с идиопатично и хронично възпаление на гастроинтестиналния тракт (ГИТ). Етиологията е неизяснена и се смята, че възникват в резултат на патологичен имунен отговор към определен антиген или дисбаланс на чревна флора при генетично предразположени лица [107]. Според последните данни, честотата на ХВЧЗ нараства в целия свят, особено в Северна Европа и Северна Америка. Диагнозата се поставя на базата на клинична оценка, серумни изследвания, образни изследвания, фекални маркери за възпаление и ендоскопското изследване [108].

ХВЧЗ протичат с често редуване на релапси и ремисии, като някои от тях може да протичат с хронично персистиращ тип. Когато пациентът е в активност, протичането на заболяването е свързано с тежки прояви, което налага продължително лечение и може да доведе до допълнителни усложнения [107].

Ключова елемент при ХВЧЗ е наличието на интестинално възпаление, чиято локализация, разпространеност и тежест повлиява естествения ход на заболяването [109]. Наличието на интестинално възпаление е признак за активност на заболяването и това е основна причина за прогресивно чревно увреждане [107][109]. От съществено значение е правилното диагностициране и стадиране на тежестта на интестиналното възпаление, за

да се оцени ефикасността на провежданото лечение, да се изключат усложненията и да се предотврати прогресирането на заболяването [23].

4.7.1 Биохимична и ендоскопска ремисия при ХВЗЧ

През последните години, целта на лечението при ХВЗЧ е да се преодолее интестиналното възпаление и да се постигне лигавичното оздравяване, което постепенно да доведе до постигане на клинична ремисия и състояние на дълбока ремисия (състояние на клинична, биологична, ендоскопска и по възможност хистологична ремисия) [110]. Ремисията е термин, който е доста дискутабилен в научната литература и целта на лечението са определя от това да се постигне така нареченото „мукозно оздравяване“. Според научните доказателства мукозното оздравяване е оптималната терапевтична цел при която може да кажем, че пациентът е в ремисия [107][109][111].

При пациенти в ремисия (ендоскопска и ФКП в норма), много често се установява необяснима хронична водниста диария при негативни копрокултури [112]. Хроничната диария при пациенти в ендоскопска ремисия се интерпретира неправилно почти винаги в клиничната практика – очаква се редуване на периоди с активност и ремисия, а пациентите могат да имат „невъзпалителни“ причини за диария. Неправилната интерпретация на това състояние води до ненужно интензифициране на терапията дори при неясни ендоскопски изменения по лигавицата. В следствие се стига и до усложнения в резултат на неправилно лечение. [68].

4.7.2 Малабсорбция на жлъчни киселини при ХВЗЧ в ремисия

МЖК е често и обичайно negliжирана при ХВЗЧ пациенти, особено при тези със засягане на терминалния илеум. Това е поради факта, че терминалния илеум е натоварен с функцията да реабсорбира свързаните жлъчни киселини в ентерохепталния кръговрат. При пациенти, които са с хронично дългогодишно протичане и са в ремисия, също се докладва наличие на нарушен реабсорбция на жлъчни киселини [64][112]. Това е подкрепено и от проучване в детската популация, където пациенти с БК и засягане на терминален илеум с активност или в ремисия имат до 86% МЖК [80]. Други автори като Jung et al. [113], демонстрират сигнификантно редуцирана експресия на апикалния натриев рецептор за жлъчни киселини, който отговаря за реабсорбцията на жлъчни киселини в биопсии от пациенти с БК в ремисия и без никакви белези за възпаление. Честотата на МЖК при БК зависи от разпространеността на заболяването и тежестта на БК и дали е свързана с операции в терминалния илеум [113].

Нарушеният метаболизъм на жлъчните киселини се установява при пациентите с ХВЗЧ с илеално засягане и дори при тези в клинична ремисия, но не е оценено адекватно от гастроентеролозите. Въпреки, че МЖК е налична при много пациенти, все още се разработват различни диагностични тестове, които да помогнат в това да разграничат, които пациенти са подходящи за лечение с хелатори на фона на тяхната ремисия [112].

Поддържащото лечение на пациенти с ХВЗЧ които са в ендоскопска ремисия, но имат хронична водниста диария обикновено се провежда със същите медикаменти с които е индуцирана ремисията, като Месалазин, Азатиорпин и биологични препарати [68]. Проблемът най-често се появява

когато при пациентите в ремисия различни гастроентеролози започват приложението на други различни медикаменти и много рядко се прави $^{75}\text{SeHCAT}$, за да се установи дали при тези пациенти се касае за МЖК. Ако се установи тази причина, е оправдано лечение с приложение на хелатори на ЖК, като в последно време започват да се разработват и нова група медикаменти (FXR – агонисти) [64].

4.8 Хронични възпалителни заболявания на червата след хирургична интервенция

Докато УК е болест, която засяга дебелото черво, приблизително 25%-30% от БК имат изолирано илеално засягане, като 30-55% имат илеоколонно засягане. При наличие на илеалното засягане или предхождащи резекции на тънко черво (резекция на илеума – IR-CD, дясна хемиколектомия) се предизвиква значителна МЖК, което довежда до диария по типа на малабсорбция на жлъчни киселини [56].

Дисфункция или резекция на илеума може да доведе до МЖК с тежка и значителна диария предизвикана от ефекта на жлъчните киселини върху аденилат циклазата в лигавицата на колона, което да доведе до увеличен пермеабилитет [56]. Дължината на резецирания илеален сегмент (IR) по-малко от 100см. може да предизвика МЖК, докато резекция на илеума над 100см. може да доведе до стеаторея, което пък до нарушение в ентерохепаталния кръговрат на ЖК. Така или иначе е доказано, че БК в активност може да доведе до по-изразена МЖК с намаление на абсорбцията на жлъчни киселини и намаление на жлъчните рецептори в дебелото черво. Диария която се причинява от засягане на терминалния илеум се класифицира като МЖК тип 1 [56].

4.8.1 Ролята на обема на тънкочревна резекция при IBD

При проучването на Borghede et al. [114], в което 39 от 43 пациенти с БК след илеална резекция развиват МЖК (91%, CI: 78%–87%), като средната дължина на резекцията на тънко черво е 37см и най-често е резецирано дисталното тънко черво. Дължината на резекцията на тънко черво е варирала от 7 до 200см, като интересен факт е, че това не е корелирало с тежестта на МЖК отчетена посредством ⁷⁵SeHCAT, но корелира със C4 [64][114]. Двама от тези пациенти са имали <5% задръжка на жлъчни киселини при резекция от 25см по дължина и след това са развили и SIBO [114].

МЖК съществува като важен ко-фактор в патогенезата на диарията при БК, но оптимален метод за диагнозата на МЖК е все още трудно да бъде намерен. В миналото се е ползвало емпирично лечение с курс на лечение с хелатори на ЖК и след това се е проследявал ефекта от лечението. Основният проблем при този подход е, че ако не се дават на правилно селектирания пациент, ще има обратен ефект, странични ефекти, в много случаи може да е субоптимално лечението и неправилно титриране [56][59].

4.8.2 Диагностични тестове за МЖК при тънкочревна резекция

Най-честият използван диагностичен тест при ХВЗЧ след резекция за определяне на МЖК е SeHCAT. Този тест не е наличен в повечето Европейски държави (наличен е само в 8), като липсва и в България [59][115]. Фактът, че не само има радиационно натоварване, но и това, че пациентът се нуждае от две посещения, за да се извърши теста го прави доста труден за осъществяване. Самият тест SeHCAT е доказано, че трудно може да определи степента на МЖК при състояние с ускорен пасаж и ускорено транзитно време (transit time) [59][115]. Изследването на C4 има

подобна диагностична точност, като корелира значително с SeHCAT и може да бъде изследван при пациенти с IBD след хирургични резекции [59][115][66]. При пациенти с ХВЗЧ, които са претърпели хирургична интервенция е патофизиологично доказано, че имаме налична МЖК, но за да измерим в каква степен или да проследяваме тези пациенти за да може да титрираме дозата на холестирамина за по-точно лечение ни е нужно използването на лесен и удобен биомаркер [115][66].

В литературата за ХВЗЧ след резекция има оскъдни данни за МЖК, като най-много публикации имат Battat et al. [59] и екипът на Lenicek et al. [64], които екипи са изследвали различни биомаркери при IBD и МЖК. Battat демонстрира, че пациенти с УК имат средни стойности на С4 от 11.8 ng/mL., а пациенти с БК и резекция на илеума (IR) и илеит (документирано ендоскопски) имат средна концентрация на С4 от 100.0 ng/mL. (P compared to UC < 0.0001), което е 10 пъти повече. Същият екип докладва, че БК без резекция нямат значително повишена средна концентрация на С4 спрямо УК, независимо дали имат възпаление в терминалния илеум. Авторите изчисляват, че горна граница (cut-off) от С4 от 48.3 ng/mL или по-голяма идентифицира пациенти с МЖК и IBD с чувствителност от 90.9% и специфичност 84.4%. Когато са анализирани данните за пациентите с тези прагови стойности на С4 и комбинирани данните със cut-off концентрации на FGF-19 <60 pg/mL, чувствителността се е повишила на 91% и специфичността на 95.5% за IBD пациенти. Стойностите на С4 и на FGF-19 корелират противоположно и кореспондират с броя на изхожданията дневно при IBD пациентите [59]. За разлика от ⁷⁵SeHCAT при С4 тежестта на МЖК е асоциирана с обема на резекция на тънкото черво и сравнена със здрави контроли, има сигнификантна разлика в стойностите на С4 при резецирани

IBD и здрави контроли (12ng/mL vs 62ng/mL). Според авторите на това проучване, се МЖК се открива и при 14% от активните БК пациенти с илеит, които не са резецирани [64].

4.8.3 Лечение на МЖК при ХВЗЧ след тънкочревна резекция

Първо би трябвало да се спазват всичките препоръки на ЕССО за пострецидивно лечение след оперативна интервенция при БК и УК [116][117]. Основният проблем при тези пациент е справянето с МЖК, като това може да стане чрез хелатори на ЖК [85]. В един мета-анализ публикуван през 2014г., се установява, че холестирамин и холестипол са ефективни методи на лечение на симптоми на МЖК, но трудно се толерират от пациентите и редуцират биоактивността на допълнително приеманите медикаменти. Алтернативни терапии (включващи холесевелам и алуминиум хлорид) съпроводени с диетични препоръки, може да допълнително да подобрят състоянието на тези пациенти и да покажат добри резултати [117][118]. Новите проучвания с обетихолева киселина показват иновативен подход на таргетна терапия за лечение на тези състояния, които в бъдеще могат да са доста по-ефективни [118]. При тези пациенти много трудно се контролира диарията поради комбинираната ѝ етиология след резекцията [85]. Най-тежките форми на МЖК се установяват при пациенти с БК след хирургична резекция, но МЖК може да е налице и при не резецирани болни независимо от локализацията [114]. Използването на лабораторни тестове за МЖК трябва да стане част от алгоритъма за диагноза на БК и да се идентифицират потенциални кандидати за лечение с холестирамин или по-нови молекули. Наличните С4 и FGF-19 може да се окажат важни биомаркери за МЖК при оперирани болни с ХВЗЧ [64].

5. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

5.1 Цел

Да се изясни ролята на биомаркерите за малабсорбция на жлъчните киселини (МЖК) и възпалението на чревната лигавица в патогенезата и значението им за клиничната оценка при пациенти с хронична водниста диария свързана с микроскопски колит, синдром на дразнимото черво и хронични възпалителни заболявания на червата в ремисия.

5.2 Задачи

За изпълнението на тази цел си поставихме следните задачи :

1. Да се разработи и внедри диагностичен алгоритъм за клинична оценка на пациенти с хронична водниста диария.
2. Да се проучи честотата на микроскопския колит, клиничното значение, диагностичните възможности при пациенти с хронична водниста диария.
3. Да се установи диагностичната стойност и клиничното приложение на серумния Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) и фекалните свободни жлъчни киселини “total free faecal bile acids” (TFFBA), като маркери за МЖК при пациенти с микроскопски колит, болест на крон, улцерозен колит и СДЧ.
4. Да се оцени относителната тежест на МЖК и ролята на чревното възпаление при пациенти с хронична диария чрез биомаркерите за

МЖК и фекалния Eosinophil-derived neurotoxin/Eosinophil protein x (EDN/EPX).

5. Да се направи сравнителен анализ на изследваните биомаркери за МЖК (FGF19, TFFBA) и възпалението на чревната лигавица (EDN/EPX) с утвърдения маркер за възпаление – фекален калпротектин (ФКП).
6. Да се идентифицират биомаркери за МЖК при пациенти с БК и УК в ендоскопска ремисия и налична необяснима хронична водниста диария.
7. Да се установи ролята на FGF19 и TFFBA, като маркери на МЖК при пациенти с БК и УК след хирургични интервенции (десностранна хемиколектомия или ПРАА).

6. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

6.1 Групи изследвани лица по диагнози

Проучването включва 120 лица, от които 109 пациенти, 55 жени (50.4%) и 54 мъже (49.6%), на средна възраст 48.2год. \pm 15г. (22-87г.), и 11 здрави доброволци (6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41г. \pm 14г., 22-61г.) преминали през Клиниката по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ” за периода януари 2017 – март 2019 година, разпределени в следните основни групи, според основната диагноза:

Група 1 - (Active IBD) - БК и УК в активност (релапс)

Група 2 - (IBD in Remission) – БК и УК в ендоскопска ремисия с налична хронична водниста диария

Група 3 - (IBD after surgery) – БК и УК след хирургична интервенция с хронична водниста диария

Група 4 - (IBS-D) – СДЧ с хронична диария

Група 5 - (MC) – Микроскопски колит (МК)

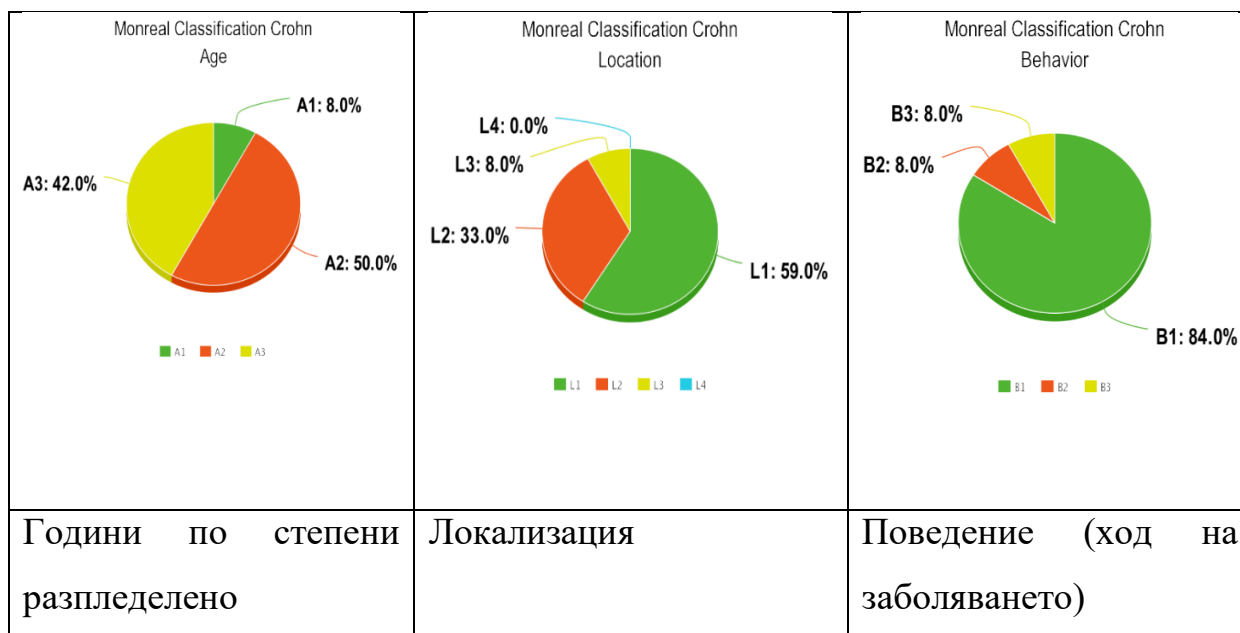
Група 6 - (Healthy subjects) - Здрави доброволци (зdravi контроли)

6.1.1 Група 1 (Active IBD) – Болест на Крон и Улцерозен колит в активност

Разпределението в тази група (n=30) е 12 с БК (40%) и 18 (60%) с УК в ендоскопска и биохимична активност на заболяването. Диагнозата е поставена на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии [117][119][120]. Клиничната активност за БК е оценена чрез

индекса на Best - Crohn's disease activity index (CDAI), като за активност е прието над CDAI >220 (Таблица 6-2). Ендоскопската активност е определена като наличие на лигавични изменения (ерозии, язви, афти) по време на илеоколоноскопията.

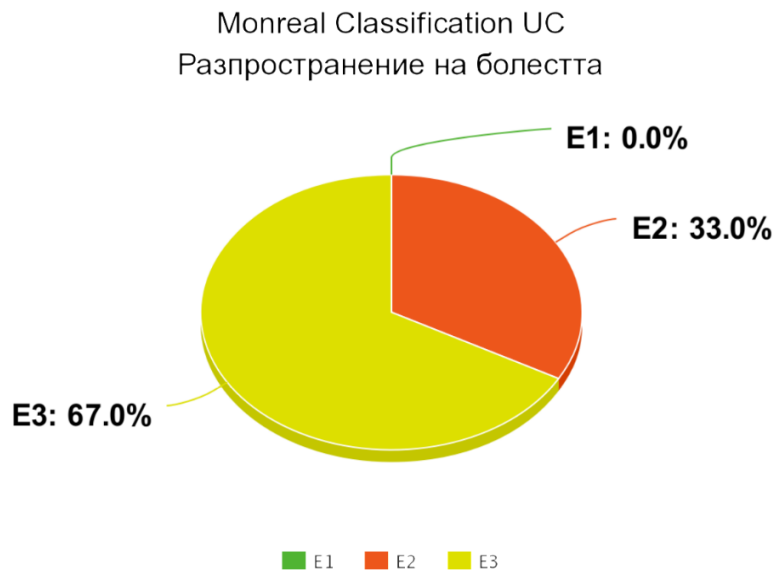
Локализацията на БК се преценени чрез класификация от Монреал 2005г. (Таблица 6-3) от които пациентите с БК (8%) са диагностицирани като (A1), n=6 (50%) – като (A2) и 5 (42%) са стадирани като (A3). При n=7 (59%) пациенти са с локализация на болестта в илеума (L1), n=4 (33%) – с колонна локализация (L2) и n=1 (8%) – с илео-колонна локализация (L3). При нито един пациент (0%) включен в това проучване с диагноза БК няма засягане на горния ГИТ (L4). По отношение на протичането на болестта, n=10 пациенти (84%) са с възпалителен фенотип (B1), 1 (8%) – със стриктуриращ (B2) и n=1 (8%) – с пенетриращ фенотип (B3) (Фигура 12). При 1 (8%) имат перианална болест. При 60% от пациентите се класифицират като A2 L1 B1.



Фигура 12. Демографско разпределение на пациентите с болест на Крон (БК) по възраст, локализация на заболяването и ход на протичане

Диагнозата УК е поставени на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии (Таблица 6-5). Клиничната и ендоскопската активност е оценена чрез Endoscopic Mayo score (EMS) (виж Таблица 6-6).

Разпространението и тежестта на заболяването са преценени чрез класификацията от Монреал от 2005 г. (виж Таблица 6-4). С улцерозен проктит (E1) са 0 (0%) от пациентите, с левостранен колит (E2) - 6 (33%) и с разпространен или панколит (E3) - 12 (67%) пациенти. По отношение на активността разделихме пациентите в ендоскопска и биохимична активност активност в група 1 и тези в ендоскопска и биохимична ремисия разпределени в група 2. Като в това проучване са включени пациенти само с умерено-тежка активност (S2) и с изразена тежест на болестта, които са част от група 1 (Фигура 13).



Фигура 13. Демографско разпределение на пациентите с улцерозен колит (УК) по разпространеност на заболяването

В тази група пациенти с УК и БК (в клинична и ендоскопска активност) изследвахме биомаркерите EDN/EPX, ФКП, FGF19 и TFFBA,

като проведохме и сравнителен анализ със здрави контроли, за да определим диагностичната стойност на тези биомаркери при УК и БК в активност (релапс). Сравнихме получените резултати с описаните до момента в България и по света [7][6][116].

6.1.2 Група 2 (IBD in Remission) – БК и УК в ендоскопска ремисия и налична хронична водниста диария

Разпределението в тази група е (n=21) пациента с БК са n=9 (43%) и n=12 (57%) с УК в ендоскопска и биохимична (ФКП в норма) ремисия, но с данни за хронична водниста диария с необясним характер. Диагнозата БК е поставена на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии [117][119][120]. Клиничната активност за БК е оценена чрез индекса (CDAI), като за ремисия е приета под CDAI <150 и при всички пациенти е изследван ФКП, който е нормални граници (**Таблица 6-2**). Диагнозата БК е поставена по установените критерии и Монреалската класификация (**Таблица 6-3**), от които пациентите с БК е n=1 (11%) са диагностицирани като (A1), n=7 (78%) като (A2) и n=1 (11%) са стадирани като (A3). При n=8 (88%) пациенти са с локализация на болестта в илеума (L1), n=1 (12%) с колонна локализация (L2) и n=0 (0%) – с илео-колонна локализация (L3). Нито един от пациентите (0%) включени в това проучване с диагноза БК нямат засягане на горния ГИТ (L4). По отношение на протичането на болестта, n=8 пациенти (88%) са с възпалителен фенотип (B1), n=1 (12%) – със стриктуриращ (B2) и n=0 (0%) – с пенетриращ фенотип (B3). При нито един пациент с БК от тази група n=0 (0%) не е открита перианална болест.

Диагнозата УК е поставени на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии (**Таблица 6-5**). Клиничната и ендоскопската активност е оценена чрез EMS (виж **Таблица 6-6**).

Разпространеността и тежестта на заболяването са преценени чрез класификацията от Монреал от 2005 г. (**Таблица 6-4**). С улцерозен проктит (E1) са n=0 (0%) от пациентите включени в групата, с левостранен колит (E2) – n=6 (50%) и с разпространен или панколит (E3) – n=6 (50%) пациенти. По отношение на определянето на активността на заболяването, към момента на включването на пациентите в група 2, се базирахме на оценката по Mayo score (виж **Таблица 6-5**). При пациенти в ендоскопска и биохимична ремисия с необяснима хронична водниста диария изследвахме серумните и фекалните биормакери (FGF19 и TFFBA), като сравнихме биомаркерите за чревно възпаление EDN/EPX с установения стандарт ФКП [7][6].

6.1.3 Група 3 (IBD after surgery) – БК и УК след хирургична интервенция с хронична водниста диария

Разпределението в тази група е (n=21) с доказана БК са n=17 (80%) и n=4 (20%) с УК след проведени хирургични интервенции на ГИТ (десностранна хемиколектомия, тънкочревна резекция на терминален илеум или проктоколектомия с ПРАА). От БК с тънкочревна резекция са n=9 (53%) и дясна хемиколектомия с резекция на илеума са n=8 (47%). Всички пациенти са оценени клинично и физикално при постъпването си в Клиниката с данни за хронична водниста диария, като след попълването на въпросника за пациенти с хронична диария е установена предходна оперативна интервенция (виж. **Таблица 6-1**). Пациентите от тази група

проведоха пълен обем лабораторни, фекални (биомаркерите са изследвани преди колонскопията), паразитологични, образни и ендоскопски изследвания, след което са уточни тяхната диагноза (БК или УК), както и обема на тяхната резекция. Диагнозата БК е поставена на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии [117][119][120]. В тази групата от пациенти след десностранна хемиколектомия или тънкочревна резекция беше използван Rutgeerts' score за оценка на активността на заболяването i0 – пост хирургична ремисия, i1- пост хирургична ремисия, i2 - умерен пост-хирургичен рецидив, i3 – напреднал пост-хирургичен рецидив, i4 – напреднал и наличен пост-хирургичен рецидив [121].

Диагнозата УК е поставени на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии. При проведените лабораторни, образни и ендоскопски изследвания се установява наличен J-rouch (ИРАА) и се потвърждава проходимостта на анастомозите. Всички от изследваните пациенти с ИРАА бяха с над 3 воднисти изхождания дневно, като не се повлияват от предписаната до момента терапия.

При всички пациенти в тази група е изследван ФКП, като маркер за чревно възпаление и сравнен със стойностите на FGF19, TFFBA, EDN/EPX за да се определи тяхната роля като маркери за откриване на МЖК независимо от чревното възпаление.

6.1.4 Група 4 (IBS-D) – Синдром на дразнимото черво с диария

Диагнозата IBS-D (n=23) в тази група се постави на базата на клинично-лабораторни, фекални, микробиологични, паразитологични, образни изследвания, гастроскопия с дуоденална биопсия и илеоколоноскопия с

биопсия на терминален илеум и дебелото черво. Всички пациенти от група 4 са отговорили на въпросника разработен в хода на тази дисертация (с налична BSS скала – виж. **Таблица 6-1. Анкетна карта (въпросник) за пациенти с хронична диария**) и отговарят положително на ROME IV критериите за пациенти с IBS-D [122]. При всички пациенти от тази група, хистологичният резултат от биопсиите на дебелото черво е разгледан от двама независими патологоанатома и е отхвърлена потенциална друга причина за диаричните изхождания. При всички пациенти е проведен H₂-дихателен тест с лактулоза, за да бъде изключена евентуална причина за тънкочревен бактериален свръхрастеж. При всички пациенти (n=23) е изследван ФКП, който е със стойности под 100 мг/гр. При всички от пациентите е проведено серумно изследване на анти-тъканна трансглутаминаза (IgA+IgG) и тотално количество на серумно имуноглобулини. При всички пациенти от тази група са изследвани и серумните нива на TSH.

6.1.5 Група 5 (MC) – Микроскопски колит (МК)

Разпределението в тази група е (n=14) от които n=12 (85%) са с колагенов колит (КК) и n=2 (15%) са с лимфоцитен колит (ЛК). Всички пациенти включени в това проучване са отговорили на въпросника разработен в хода на тази дисертация (налична BSS) с проведени пълни клинично-лабораторни, фекални, микробиологични, паразитологични, образни изследвания, гастроскопия с дуоденална биопсия и илеоколоноскопия с биопсия на терминален илеум плюс дебелото черво по повод на хронична водниста диария. При всички от тези пациенти хистологичният резултат от биопсиите на дебелото черво е разгледан от двама независими патологоанатома, като е поставена диагноза МК (ЛК или КК).

Проведено е измерване на дебелината на колагеновия слой посредством окуляр микрометър и преброени броя на интраепителните лимфоцити на зрително поле. При тази група пациенти е проведен H₂-дихателен тест с лактулоза, за да се отхвърли тънкочревен бактериален свръхрастеж. При тази група е изследван ФКП, като маркер за чревно възпаление и са сравнени резултатите с другите биомаркери от това проучване. При всички от пациентите е проведено серумно изследване на анти-тъканна трансглутаминаза (IgA+IgG), включително и тотално количество на серумно имуноглобулини, за да се отхвърли евентуална причина за глютенена ентеропатия. При всички пациенти от тази група са изследвани и серумните нива на TSH.

6.1.6 Група 6 – Здрави доброволци (Контролна група)

Като контроли са включени 11 здрави доброволци, 6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41г. ± 14г. (22-61г.) без анамнеза за заболявания на ГИТ и без никакви оплаквания в момента на вземане на кръвен серум или в момента на предоставяне на фецес за изследване на ФКП и TFFBA. В контролната група са включени лица без анамнестични или биохимични данни за органично заболяване на ГИТ. Стойностите на ФКП е нормален при всички от тях – под 50ммгр.гр (100%).

6.2 ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

6.2.1 Включващи и изключващи критерии

Включващите критерии за настоящото проучване бяха: (1) възраст над 18г, (2) тотална колоноскопия с интубация на цекума и интубация на терминалния илеум, (3) биопсии (поне 1 от тънко черво и поне по 2 биопсии от всеки сегмент на дебело черво за доказване на МК [25][18], (4) попълнено информирано съгласие, (5) предоставяне на фекални проби в рамките на 1-2 дни преди извършването на колоноскопия (6) вземане на серум за изследване на FGF19 при всички пациенти.

Изключващите критерии за текущото проучване бяха: (1) невъзможност за извършване на тотална колоноскопия, (2) неадекватна фекална проба, (3) наличие на колоректален карцином, (4) бременност, (5) инфекциозен колит, (6) първичен имунен дефицит, и (6) наличие на тежки съпътстващи хронични физически или психически заболявания.

6.2.2 Анамнеза и физикален статус на пациентите и контролите

Подробни анамнеза и статус са снети на всички пациенти и здрави контроли, като част от това проучване. На всички пациенти е раздадена анкетна карта (**Таблица 6-1**) в която да попълват приема на медикаменти и да отговорят на серия на въпроси свързани с евентуално откриване на причината за тяхната хронична диария.

Въпросник (Анкетна карта) за пациента с хронична диария	
Трите имена:.....	Днешна дата :.....
На колко сте години?:.....	Телефон.....
	Пол: Мъж / Жена (оградете вярното).
Въпроси:	Моля, оградете верния отговор
1. Приемате ли медикаменти /лекарства/?	Да / Не


Ако да: Моля, избройте медикаментите, включително тези свързани с други проблеми освен чревните. Моля упомене дозата на приема, както и продължителността на приемане на лекарствата или билки/отвари/зелен чай.

„Пример: Аспирин 100мг.“	по 1 таб. Вечер	„приемам го от м.май 2015 до м.април 2016“
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

Ако случайно сте забравили да споменете следните медикаменти изброени по-долу в таблицата, моля оградете, тези които приемате


Ранитидин/Ranitidin/	Омепразол/Omeprazol/	Ланзопразол/Lanzoprazole/	Флаваноид/Flavanoid/	Сусло 3 fort / Цикло/
Ентокапоне/Entocapone	Клозапин/Clozapine/	Тиклопидин/Ticlopidine/	Инхб. на протонна пом.	Аспирин/Aspirine/
Олмесартан/Olmesartan	Ибупрофен/Ibuprofen/	Ацетизал/ Acetysal/	Нурофен/Nurophen/	Аcarbose/Акарбоза/
Лаксативи/Разхлабвачи	Дулколакс/Dulcolax/	Други НСПВС	Сертролин/Sertroline/	Диклак /Diac/

2. Колко на брой изхождания/дефекации/ имате дневно? 1 2 3 4 5 6 7 8+
3. Какви на форма и консистенция са вашите изпражнения (виж схемата)? Моля, оградете верния отговор




▶ **ТИП 1**

Отделни малки твърди топчета (ядки).




▶ **ТИП 2**

Изпражнения, съставени от слепнали помежду си топчета.




▶ **ТИП 3**

Като салам, но с неравна повърхност.




▶ **ТИП 4**

Като пластилин, меки и гладки.



▶ **ТИП 5**


Отделни меки части с гладки граници.



▶ **ТИП 6**

Отделни части с неравномерни граници, кашава консистенция.

Моля отбележете с или „кръгче“



▶ **ТИП 7**

Воднисти, без твърди частици.

вида на вашите
изпражнения по показанта
скала. **Обърни листа!**

→

4. Има ли примеси на слюз в изпражненията? Да / Не (моля оградте верния отговор)

5. Има ли примеси на кръв в изпражненията? Да / Не (моля оградте верния отговор)

6. Колко време е продължителността на диарията? 1-седмица 2сед. 3сед. 4сед. 5сед. повече от 6 седмици (моля оградте верния отговор)

7. Имате ли диарични изхождания през ноща? Да / Не

8. Свързвате ли диарията с прием на определени храни? Да / Не (моля оградте верния отговор)
/моля избойте ги...../

9. Имате ли зацапване на бельото от фекалии, незадържане на фекалии, „изпускане по голяма нужда“и други симптоми на фекална инконтиненция? Да / Не (моля оградте верния отговор)

10. Имате ли поне от 6 месеца насам непрекъснато или периодично коремна болка или неприятно усещане(дискомфорт) в коремната област ?	Да / Не
Тези оплаквания с коремният дискомфорт намаляват ли сед изхождане по голяма нужда?	Да / Не
Свързвате ли болката и дискомфорта с промяна в честотата на изхожданията?	Да / Не
Свързвате ли болката и дискофорта с промяна в твърдостта и формата на изпражненията	Да / Не

11. Имате ли загуба на тегло през последният месец? Да / Не (моля оградте верния отговор)
/ Колко килограма сте загубили и за какъв период от време:.....?/

12. Чувствате ли умора, отпадналост или слабост? Да / Не (моля оградте верния отговор)

13. През последният един месец да има промяна в диетата? Да / Не (моля оградте верния отговор)

14. Претърпели ли сте през последните 2 години някакви хирургични операции, лъчелечение, облъчване с радиация или Химиотерапия? Какви и Да / Не (моля оградте верния отговор)
кога:.....

15. Имате ли операция на операция на тънкото черво или жлъчния мехур ? Да / Не

16. Имате ли през последните 3 месеца пътуване в чужбина (екзотична страна, Африка, Азия)? Да / Не (моля оградте верния отговор)

17. Имате ли придружаващи аутоимунно заболявания? Да / Не (моля оградте верния отговор)
/Какви? Пр: Ревматоиден артрит, Синдром на Съогрен и др.“ , избойте ги:
.....

18.	Имате ли проблеми с щитовидната жлеза? (отговор)	Да	/	Не	(моля оградте верния
19.	Имате ли диагностицирана Глутенова ентеропатия /Цьолиакия/? (отговор)	Да	/	Не	(моля оградте верния
20.	Имате ли, непоносимост към пиене на прясно мляко? (отговор) /Лактозна непоносимост(лактазен дефицит)?/	Да	/	Не	(моля оградте верния
21.	Имате ли Захарен диабет (Нарушен глюкозен толеранс)? (отговор)	Да	/	Не	(моля оградте верния
22.	Имате ли побеляване, посиняване или зачервяване (отговор) на пръстите на ръцете? / Т. нар. циркулаторни нарушение по тип Рейно/	Да	/	Не	(моля оградте верния
23.	Пушите ли цигари/тютюн/? (отговор) По колко цигари дневно.....? От колко години пушите?:.....	Да	/	Не	(моля оградте верния

Таблица 6-1. Анкетна карта (въпросник) за пациенти с хронична диария

6.2.3 Определяне на клиничната и ендоскопска активност (използвани скорови системи за БК и УК)

В настоящото проучване използвахме най-често употребявания в клиничните проучвания индекс за оценка на болестната активност при БК - CDAI, както и препоръките на Българското Дружество по Гастроентерология. (Таблица 6-2). [120][123]. Стойностите на CDAI варират между 0 и 650. CDAI <150 е показател за клинично неактивна БК (ремисия), а стойности над 450 съответстват на тежка активност (виж Таблица 6-2). Стойности на CDAI между 150 и 219 се дефинират като лека активност, а между 220 и 450 като умерена активност на заболяването [124]. В група 1 са включени пациенти над 220 CDAI. В група 2 са включени пациенти под 150 CDAI [124].

Показател	Фактор на значимост (x)	Точки =
Брой течни или кашави изхождания –като сума за 1 седмица	x2	
Болки в корема –като сума за 1 седмица (липсват=0, леки=1, умерени=2, силни=3)	x5	
Общо състояние –като сума за 1 седмица (добро=0, леко увредено = 1, лошо = 2, много лошо =3, изключително лошо = 4)	x7	
Усложнения (брой) артрит, ирит, увеит, афтозен стоматит, гангренозна пиодерма, нодозен еритем, фисури, чревни фистули, анални периректални абсцеси, $t > 38^{\circ} \text{C}$ през седмицата	Брой x20	
Симптоматично противодиарийни лекарства (да. 1)	x30	
Резистентност/формация в корема (липсва=0, вероятна=2, сигурна=5)	x10	
Хематокрит (жени=42 - измерената стойност на хематокрита, мъже =47 - измерената стойност на хематокрита)	x6	
Тегло 1-настоящо тегло/стандартно тегло	x100	
Общо		
Таблица 6-2. Индекс на Best - Crohn's disease activity index (CAI)		

Използвахме класификацията от Монреал за оценка и класификация за БК [119][120].

	Виена	Монреал
Възраст при диагностициране	A1 под 40 г.	A1 под 16 г.
	A2 над 40 г.	A2 между 17 г. и 40 г.
		A3 над 40 г.
Обхващане / Локализация	L1 Терминален илеум	L1 Илеум
	L2 Дебело черво	L2 Дебело черво
	L3 Илеум+дебело черво	L3 Илеум+дебело черво
	L4 Горен ГИТ	L1-3 + L4 зазрягане на горен ГИТ
Протичане на болестта	B1 Нестриктурираща, непенетрираща	B1 Нестриктурираща, непенетрираща
	B2 Стриктурираща	B2 Стриктурираща
	B3 Пенетрираща	B3 Пенетрираща
		B1-3 + p - Перианална болест

Таблица 6-3. Виенска и Монреалска класификация за БК [119][120]

В настоящото проучване използвахме най-често употребявания в клиничните практика индекс (скор) за оценка на болестната активност при

пациенти с УК и градирахме болните според приетите изисквания от Българското дружество по Гастроентерология. За обхвата за УК използвахме класификацията от Монреал [116][120][123].

Обхват	Зона анатомична
E1 Язвен проктит	Ректум
E2 Левостранен язвен колит (дистален)	Обхващане на колоректум, дистално от лявата дебелочревна флексура
E3 Разпространен язвен колит (панколит)	Обхващането се разпростира и проксимално от лявата дебелочревна флексура (панколит) [116][120][123].

Таблица 6-4. Монреалската класификация за обхвата на УК

Мауо-скор	0	1	2	3
Брой на дефекациите /дн.	Нормален	1-2/дн. >норм.	3-4/дн. >норм.	5/дн. >нормалното
Кръв във изпражненията	Няма	Следи	Очевидна	Предимно кървава
Ендоскопски образ лигавица	Нормална	Лека ранимост	Умерена ранимост	Спонтанно кървене
Общо състояние оценено според лекаря (GPA)	Нормално	Леко увредено	Умерено увредено	Тежко увредено

Таблица 6-5. Мауо-класификация (скор) за оценка на тежестта при УК [116][120][123].

За по-добро разграничаване и правилно стадиране и класифициране на болните с поставена диагноза УК и последващото им разпределение в група 1, група 2 или група 3 се използва ендоскопското точкуване между 0 и 3т. според приетите консенсуси в България и Европа [116][120][123].

Скала	0 точки	1 точка	2 точки	3 точки
Endoscopic Mayo score (EMS)	Нормално	Редуциран съдов рисунък, лека ранимост	Загуба на съдов рисунък, ерозии, ранимост	Язви, спонтанно кървене
Таблица 6-6. Ендоскопско точкуване (скориране) при УК според EMS [116][120][123].				

При пациентите с БК и след проведена хирургична интервенция използвахме Rutgeerts score, като тези които са под i1 или равни на i0 приехме като ендоскопска ремисия. При пациентите, при които Rutgeerts score е равно или над i2, приехме за ендоскопски рецидив и активност (Таблица 6-7).

Rutgeerts score	Ендоскопска находка и интерпретация
i0	Без лезии в дисталния (нео-илеум) илеум (post-surgery remission)
i1	Не повече от 5 афтоидни лезии в дисталния (нео-терминален) илеум (post-surgery remission)
i2	Повече от 5 афтоидни лезии с нормална мукоза между лезиите, или прекъсващи зони или язви по-големи от 1 см. около анастомозата (substantial post-surgery recurrence)

i3	афтоиден илеит и дифузно възпалена мукоза (advanced post-surgery recurrence)
i4	Дифузно възпаление с дифузни , дифузни язвени лезии (advanced post-surgery recurrence)
Таблица 6-7. Rutgeerts score за стадиране при БК след резекция	

6.2.4 Лабораторни изследвания, микробиология и дихателен тест

Стандартни лабораторни изследвания (хематологични и биохимични) в това проучване на всички пациенти и здрави контроли са проведени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“. При всички пациенти с МК и СДЧ са проведени имунологични изследвания на серумна анти-тъканна трансглутаминаза (anti-tTG IgA+IgG) и паразитологични изследвания в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София и Националния Център по Заразни и Паразитни Болести. Микробиологичните проби са изследвани в лабораторията по микробиология и вирусология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД. При всички паразитологични изследвания на фецес пациентите са занесли прясна фекална проба в деня на изследването на ФКП и EDN/EPX. При всички пациенти с МК и IBS-D беше проведен водороден (H₂)-дихателен тест с лактулоза, за да се изключи евентуална причина за тънкочревен бактериален свръхрастеж (Gastrolyzer Breath H₂ Monitor, ME1 3QX, Bedfront Scientific Ltd, England).

6.2.5 Абдоминална ехография

При всички пациенти в проучването е извършена абдоминална ехография като стандартен метод в диагностичния алгоритъм за хронична диария от Доц. Големанов или проф. Танкова. При всички пациенти

включени в това проучването не е установена придружаваща патология на билио-панкреасната система или черния дроб, която да е пряка причина за хроничната диария.

6.2.6 Изследване на фекален калпротектин

При съответните групи пациенти и здравите контроли е изследван ФКП във фекални проби чрез бърз количествен тест, като е използван point-of-care desk-top Quantum Blue Reader® (POC Reader) метод [7][6]. Това е имунохроматографски метод базиран на ELISA. Всички тестове са извършени от дисертанта на тази тема Д-р Радислав Наков и доц. В. Наков в Катедрата по гастроентерология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, МУ-София. Тестът съдържа всички необходими материали за екстракция (Calex Cap Device), валидиране и контрол на определенията. Изследваните лица доставят фекална проба от 1 до 5 грама в подходящ за целта пластмасов контейнер. Пробите са изследвани в деня на доставяне на материала. Екстракцията се извършва със специалното устройство Calex, което позволява едновременно събиране на проба от изпражнението, хомогенизирането и разреждането ѝ без да се влиза в пряк контакт с материала. Цялата процедура по екстракция е изпълнена стриктно според инструкциите на производителя, което ни позволи да разредем фекалната проба 1:500. От получената разредка се отпипетират 60 микролитра и се накапват в специално гнездо на тест-плочката. Отчитането е автоматично и се изписва на дисплея след 12 минути. Крайният резултат се представя в микрограма на грам фецес ($\mu\text{g/g}$). Използвани са китове за ФКП на Quantum Blue® Calprotectin, Bühlmann Laboratories AG, Switzerland, като резултатите са изразени в $\mu\text{g/g}$ [125]. Всички тестове са проведени съгласно

инструкциите на производителя (Quantum Blue® Calprotectin, Bühlmann Laboratories AG, Switzerland) [125].

6.2.7 Изследване на фекален Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX)

Количеството на EDN/EPX във фекални проби се определя чрез количествен имуноензимен тест (ELISA), тип „сандвич“ на компанията Immundiagnostik AG, IDK® EDN, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany на пациенти и здрави контроли. Фекалните проби се екстрахират в екстракционни епруветки Immundiagnostik AG, IDK Extract®, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany. Изследваните лица доставят фекална проба от 1 до 5 грама в подходящ за целта пластмасов контейнер. Пробите се съхраняват на -20 °C за период до 2 месеца, според инструкциите на производителя [126]. Използването на IDK Extract® епруветки, позволява едновременно събиране на проба от изпражнението, хомогенизирането и разреждането ѝ без да се влиза в пряк контакт с материала. Цялата процедура по екстракция е изпълнена стриктно според инструкциите на производителя. Използваният ELISA тест е тип „двоен сандвич“ с две антитела (моноклонално и поликлонално), които свързват човешкия EDN/EPX. Към ямките на микроплаката, които са натоварени с високоафинитетни моноклонални антитела срещу EDN/EPX, се добавят стандарти, контроли и предварително разредени проби от пациентите. По време на първата инкубация имобилизираните моноклонални антитела се свързват с човешкия EDN/EPX в пробите. На следващия етап се добавят поликлонални заешки анти-човешки антитела срещу EDN/EPX, конюгирани с ензима пероксидаза. По време на втората инкубация се образува комплекс

от моноклонално антитяло – човешки EDN/EPX – пероксидазен конюгат. Добавянето на субстрат на ензима пероксидаза /тетраметилбензидин/, води до образуване на цветен продукт. Реакцията се спира чрез добавяне на сярна киселина и интензитета на оцветяването се определя при дължина на вълната 450 nm. Интензитета на оцветяване е правопрпорционален на концентрацията на EDN/EPX. Построява се калибрационна крива, чрез която се определя количеството на EDN/EPX в пробите от пациентите и здравите контроли. Всички проби са изработени в лаборатория по Вирусология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, МУ-София от М. Четирска и Б. Асенова. Всички тестове са проведени съгласно инструкциите на производителя Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany [126]. Използвани са китове IDK® EDN Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany [126][127]. Крайният резултат се представя в нанограм на милилитър (ng/ml).

6.2.8 Изследване на жлъчни киселини във фецес - total free faecal bile acids (TFFBA)

Количеството TFFBA във фекални проби на съответните групи пациенти и здравите контроли е определено чрез колориметричен тест (ELISA) IDK® Bile acids Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany. Изследваните лица доставят фекална проба от 1 до 5 грама в подходящ за целта пластмасов контейнер. Пробите се съхраняват на -20 °C за период до 2 месеца, според инструкциите на производителя [126]. Използването на IDK Extract® епруветки, позволява едновременно събиране на проба от изпражнението, хомогенизирането и разреждането ѝ без да се влиза в пряк контакт с материала. Цялата процедура по екстракция е

изпълнена стриктно според инструкциите на производителя. При този процес, в присъствие на излишък от thio-NAD, ензима 3-a-hydroxysteroid dehydrogenase, превръща жлъчните киселини в 3-ketosteroids, при което се образува редуциран thio-NAD/thio-NADH/. Формираният thio-NADH се определя чрез промяна на абсорбцията / ΔOD / при дължина на вълната 405 nm. Количеството на жлъчните киселини се определя чрез калибрационна крива. При този тест в съответните ямки се пипетират стандартите, контролите и изследваните проби. Добавя се реагент 1 /thio-NAD/ и след инкубация се добавя реагент 2 /ензима 3-a-hydroxysteroid dehydrogenase/. ΔOD се определя по формулата: $\Delta OD = (final\ OD - start\ OD)/2$, start OD – измерва се при дължина на вълната 405 nm на първата минута след накапване на ензима. final OD – измерва се при дължина на вълната 405 nm, 2 минути след накапване на ензима. Всички проби са изследвани в Лаборатория по Вирусология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, МУ-София от М. Четирска и Б. Асенова. Всички тестове са проведени съгласно инструкциите на производителя Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany [126]. Използвани са китове Enzymatic (ELISA) IDK® Bile acids Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany [126]. Крайният резултат се представя и преобразуван в микромол на грам фецес ($\mu\text{mol/g}$).

6.2.9 Изследване на серумен fibroblast growth factor 19 (FGF-19)

При всичките пациенти и здравите контроли са изследвани серумни нива на FGF-19 преди 09:00ч. сутрин на гладно чрез ELISA (ThermoScientific™ Human FGF-19 ELISA Kit, ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. USA), при стриктно спазване инструкциите на производителя [128].

Всички тестове са извършени в Лабораторията по Вирусология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, МУ-София от М. Четирска и Б. Асенова. Резултатите са представени в пикограмна милилитър (pg/ml). Методът представлява количествен „сандвич” имуноензимен метод (ELISA) за *in vitro* определяне на човешки FGF-19 в биологични материали (серум). Гнездата на микротитърната плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу човешки FGF-19. При процесът е използван мини-шейкър Mini-Shaker PSU-2T, Biosan SIA., Ratsupites 7, build. 2, Riga, LV-1067, Latvia [129]. По време на първия инкубационен период се извършва свързване на FGF-19, ако присъства в биологичния материал, към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. След измиване на всички несвързани субстанции, се добавя второ поликлонално антитяло, насочено срещу FGF-19 и конюгирано с ензим. След инкубацията излишъкът от несвързани субстанции се измива. Ензимната реакция се осъществява посредством добавяне на субстрат и образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопропорционален на първоначалното количество FGF-19 в биологичната проба.

6.2.10 Видеогастроскопия с вземане на материал за хистологично изследване от дванадесетопръстника

При всички пациенти с хронична диария постъпили в Клиниката по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД за диагностично уточняване е проведено видеогастроскопия и биопсия от дванадесетопръстника за евентуално отхвърляне на глютенена ентеропатия. При всички пациенти с доказана БК и при тези с УК, за които е преценено,

че е необходимо, е извършена видеогастродуоденоскопия с вземане на материал за хистологично изследване. При всички пациенти с МК и IBS-D е проведено видеогастроскопия и вземане на биопсичен материал от дванадесетопръстника. Взети са 2бр. биопсии от „парс десденденс“ в дванадесетопръстника и 2бр. биопсии от булбус дуодени. Пробите са изпратени в два различни контейнера изпълнени с формалин. При всичките 11 здрави доброволци не е проведено видеогастроскопия. Ендоскопските изследвания са извършени в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД.

6.2.11 Видео илеоколоноскопия с вземане на хистологичен материал от терминален илеум и дебело черво

При всички пациенти постъпили в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД и част от това проучване е проведена илеосколоноскопия с оглеждане 10-15см. от терминалния илеум и вземане на поне една биопсия от терминалния илеум. При всички пациенти с хронична диария по типа на IBD-D и МК са взети етажни биопсии по съответния протокол за МК (виж. **Протокол за вземане на биопсии при микроскопски колит**). Определяне на ендоскопската активност по съответните индекси за БК и УК. Подготовката за илеоколоноскопията е стартирана 24 часа преди изследването, като при пациентите се осъществи почистване на дебелото черво с макрогол 4000 (Fortrans, Beaufour Ipsen International, Paris, France). Ендоскопските изследвания са извършени в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД.

Поради сложността в използването на повечето ендоскопски индекси за оценка на активността при БК, в настоящото проучване тя бе определена

като наличие на лигавични изменения (ерозии, язви, афти) по време на илеоколоноскопията. В групата от пациенти с IBD след хирургична интервенция, при тези с БК след десностранна хемиколектомия беше използван Rutgeerts' score - за ремисия се прие i0 и i1, над i2 се прие рецидив или активност (виж. **Таблица 6-7**). За определяне на ендоскопската активност при пациентите с УК използвахме EMS, като той е най-често използван в клиничната практика. При него мукозното възпаление е оценено в 4-степенна скала (от 0 до 3), според наличието на следните ендоскопски характеристики: 0 – нормален изглед; 1 – еритема, намален съдов рисунък, лека ранимост; 2 – значителен еритем, липса на съдов рисунък, ранимост, ерозии и 3 – язви, спонтанно кървене.

6.2.12 Протокол за вземане на биопсии при микроскопски колит

При всички пациенти постъпили в Клиниката по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и обект на това проучване, при които беше осъществена илеоколоноскопия и по време на изследването не установено тежки органични лигавични изменения, е осъществено вземането на „етажни“ биопсии. Първо се взима поне 1 биопсия от терминалния илеум, след което се взимат 2бр. биопсии от колон асценденс, след това 2бр. от колон трансверзум, 2бр. от колон десценденс, 2бр. от сигмата и 1бр. биопсия от ректума. Всички тези биопсии се слагат в различни контейнери изпълнени с формалин и се изпращат за хистологична оценка. При наличие на минимални лигавични промени в илеума или колона те са биопсирани целенасочено. Този протокол е приложен при всички пациенти от групата IBS-D и МК.

6.2.13 Хистологична оценка на биопсичен материал от терминален илеум и дебело черво

При всички пациенти с взет материал от терминален илеум и дебело черво (6 отделни контейнера изпълнени с формалин) са направени нужните срезове за формалиновите блокчета, като след това са направени стандартните оцветявания за хистологичните препарати с хематоксилин и еозин (hematoxylin and eosin - H&E). Всички хистологични блокчета и хистологични препарати са направени в Отделението по Патология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“. Поставяне на диагнозата МК е на базата на H&E или по преценка на патолога (Д-р Терзиев) е проведено допълнително оцветяване с Ван Гизон (van Gieson) за по-точно определяне на дебелината субепителния колагенов слой. За определяне на по-точният брой на интраепителните лимфоцити (IEL) при някои от пациентите по преценка на патоанатома е проведена имунохистохимия с CD3. При пациенти при които е имало съмнение за амилоидоза е проведено допълнително оцветяване с “Congo red”, като при всички тези пациенти включени в текущото проучване, това оцветяване е било негативно. Всички пациенти от групите с МК и IBS-D са преразгледани при втори независим патоанатом (Д-р Кьосева) от Отделение по Патология на УМБАЛ „Александровска“ за хистологична оценка. Използван е окуляр-микрометър за определяне на дебелината на колагеновия слой в (μm) при стандартните микроскопи. Броят на IEL е определен чрез преброяване на зрително поле. Като над 20 IEL на зрително поле е прието за патология (ЛК) според Европейските препоръки консенсуси за диагноза на МК [40][23]. При всички пациенти в настоящето проучване с поставена диагноза БК и УК е по

установените хистологични критерии на Европейското дружество по Крон и Колит (ЕССО) [117][119][23].

6.2.14 Статистически методи

Данните са съхранявани в таблици на статистическата програма SPSS за Windows (Version 23.0., SPSS Inc., Chicago, USA). Статистическият анализ бе извършен от професионален статистик (Анастас Димов) към Катедра "Статистика и иконометрия" на Факултет "Приложна информатика и статистика" към Университета за национално и световно стопанство (УНСС) чрез SPSS. Допълнителните анализи на данните са извършени от Dr. Francesco Ursini, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

За анализиране на данните се използваха следните статистически методи:

- дескриптивна статистика за таблично и графично представяне на получените резултати; тест на Kolmogorov-Smirnov;
- корелационен коефициент на Spearman; Корелационен коефициент на Pearson; За целите на корелационния и линеен регресионен анализ FGF19 индексите бяха трансформирани в естествен логаритъм
- тест на Mann-Whitney; t-тест; Bonferroni Correction; ROC анализ; Fisher's Exact Test; Kruskal-Wallis Test; За ниво на значимост, при което се отхвърли нулева хипотеза бе прието $p < 0.05$.

6.2.15 Етични норми

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания в Медицински университет – София при подадено заявление към изпълнението на ДОГОВОР № Д-119/02.05.2017 г. за финансиране на

изследователски ПРОЕКТ с вх. № 8510/12.12.2016 г. към „Грант 2017“ и грант „Млад Изследовател 2017“ ДОГОВОР № Д – 136 /02.05. 2017 г., ПРОЕКТ вх. № 8487/09.12.2016 г. Преди включването всички пациенти и здрави контроли попълниха информирано съгласие. Всички субекти се съгласиха да участват след като бяха информирани за методите, процедурите и целите на проучването. Освен това, изследването е извършено в съответствие с принципите на добрата клинична практика и етичните стандарти заложи в Декларацията от Хелзинки от 1964 г. и последващите ѝ изменения. Всички здрави доброволци бяха информирани за целта на проучването и процедурите в проучването по същия протокол, както и пациентите.

6.2.16 Начин на финансиране на проучването

Използваните в хода на работата реактиви бяха закупени със средства по следните договори: ДОГОВОР № Д-119/02.05.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 8510/12.12.2016 г. към „Грант 2017“ и грант „Млад Изследовател 2017“ ДОГОВОР № Д – 136 /02.05. 2017 г., ПРОЕКТ вх. № 8487/09.12.2016г. Всички изброени проекти са получили одобрението на Комисията по етика на научните изследвания в Медицинския университет – София. Всички експерименти, свързани с дисертационния труд, са проведени в Катедрата по Гастроентерология на Медицинския университет – София и лаборатория по микробиология и вирусология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София, България.

7. РЕЗУЛТАТИ

7.1 Диагностичен алгоритъм за клинична оценка на пациенти с хронична водниста диария

На всички пациенти в текущото проучване беше раздаден въпросник с цел да се подобри изборът на диагностичен метод за всеки конкретен клиничен случай и според откритите отклонения, изследваните „биомаркери“ за чревно възпаление и МЖК, се пристъпи към ендоскопска и хистологична верификация. Всички пациенти са оценени клинично и след това са предложени последователни диагностични тестове за достигане до диагнозата (**Фигура 14. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)**)

За периода януари 2017 – март 2019 година в Клиниката по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“, гр. София преминаха 120 лица включени в това проучване, от които 109 пациенти, 55 жени (50.4%) и 54 мъже (49.6%), на средна възраст 48.2год. \pm 15г. (22-87г.), и 11 здрави доброволци (6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41г. \pm 14г., 22-61г. Всички участници в проучването са попълнили анкетна карта (въпросник) (виж. **Таблица 6-1. Анкетна карта (въпросник) за пациенти с хронична диария**). След получаването на резултатите от въпросника бяха осъществени лабораторни, образни, микробиологични и ендоскопски изследвания и беше направено следното разпределение по диагнози: IBD в активност n=30, IBD в ендоскопска и биохимична ремисия n=21 с налична неуточнена хронична диария, IBD след хирургична интервенция n=21 (десностранна хемиколектомия, илеална резекция или IPAA), Синдром на

дразнимото черво с диария $n=23$, Микроскопски колит $n=14$ и здрави контроли $n=11$ (здрави доброволци) като контролна група.

Във въпросникът беше включена снимкова (илюстративна) Bristol Stool Scale (BSS) за определяне на консистенцията на изпражненията. Във въпросника бяха зададени и въпроси за броя на изхожданията дневно. Диария беше определено, като над 3 изхождания дневно и BSS над тип 5, 6 и 7 с продължителност повече от 4 седмици.

Таблица 7-1. Разпределение по диагнози и брой пациенти

	Честото	Процент (%)	Валиден процент	Кумулативен Процент
IBD в активност	30	25,0	25,0	25,0
IBD в ремисия	21	17,5	17,5	42,5
IBD след хирургия	21	17,5	17,5	60,0
IBS-D	23	19,2	19,2	79,2
Микроскопски колит	14	11,7	11,7	90,8
Здрави контроли	11	9,2	9,2	100,0
Общо	120	100,0	100,0	

7.1.1 Анализ на специфичния въпросник (анкета) за съставяне на диагностичен алгоритъм при пациенти с хронична диария

От всички пациенти включени в анализа средният брой на изхожданията дневно (mean) докладвани са 6.66/дн. и (median) 3.00/дн. (range 1-15). Всички 109 пациенти в проучването докладваха за над 3 изхождания дневно (100%), докато здравите доброволци 11 (9.2%) докладваха за по-малко от 3 изхождания дневно ($p < 0.001$). Средната докладвана честота на изхожданията дневно при различните групи е представена на (Таблица 7-2), като в групата IBD active (активност, релапс) от пациентите докладват по средно 7.83/дн (range 3-13), при IBD remission (в

ремисия) е 5.86/дн. (range 2-9), IBD след резекция докладват средно по 9.00/дн. изхождания дневно (range 3-15), IBS-D пациентите докладват 4.65/дн, пациентите с МК докладват по 9.29/дн. воднисти изхождания и здравите доброволци (контроли) докладват по 1.36/дн. дефекации дневно. От всички включени в анализа, n=28 (23%) докладват за среден брой изхождания по форма отговарящ на Bristol Stool Scale (BSS) <6, където n=82 (77%) отговарят за среден брой дневно изхождания по BSS форма ≥ 6 ($p < 0.001$). Ние намерихме, че 90% от пациентите с функционални заболявания (IBS-D) докладват по-висок процент на BSS форма ≥ 6 , спрямо пациентите с органични заболявания, n=21/23 (91%) vs n=62/86 (72%) ($p = 0.011$). По отношение на BSS скалата 21/23 пациента с IBS-D са отбелязали BSS форма ≥ 6 . Всички данни могат да бъдат видяни на (Таблица 7-2).

Bristol Stool Scale

Groups	Средно (Mean)	N (брой)	Станд. отклонение	Минимум	Максимум
IBD - Active	6,23	30	1,006	Soft saugae, smooth	Liquid consistence
IBD in Remission	5,57	21	1,028	Lumpy and sauge like	Liquid consistence
IBD After Surgery	6,29	21	,956	Soft saugae, smooth	Liquid consistence
IBS-D	6,35	23	,885	Soft saugae, smooth	Liquid consistence
Microscopic Colitis	6,71	14	,469	Mushy consistence	Liquid consistence
Здрави доброволци	4,00	11	,447	Sausage shape	Soft blubs
Общо	6,00	120	1,130	Lumpy and sauge like	Liquid consistence

Таблица 7-2 Bristol stool scale при различните групи

При първото разглеждане на въпросника, търсихме закономерности свързани с докладване на кръв в изпражненията, като алармиращ симптом, за да степенуваме пациентите за ендоскопски изследвания. От проведенния анализ установихме, че след попълнения въпросник и осъществените всички изследвания в нашето проучване, n=17 пациента с IBD active са докладвали за кръв в изпражненията, n=1 в IBD в ремисия, n=2 при IBD след хирургична намеса, n=1 от IBS-D групата, n=0 от групата на МК и n=0 от здравите доброволци (контроли) (**Таблица 7-3**). При проведенния Chi-Square Test (тест за асоциации) установяваме статистическа разлика между групите, като при IBD active е по-изразено кървенето ($p < 0.001$) (**Таблица 7-4**). Проведохме и проучване на честота на пациентите, които докладват за наличие на слуз в изпражненията и установихме, че при n=19 (63%) в групата с IBD в активност, n=6 (28%) в IBD в Ремисия, n=8 (38%) от групата с IBD след хирургия, n=11 (47%) от IBS-D, n=4 (28%) от МК и n=0 от здравите контроли (**Таблица 7-6**).

Кръв в изпражненията при различни групи					
Брой					
		Кръв във изпражненията			Общо
		Не	Да		
Групи	IBD - Active	13	17		30
	IBD in Remission	20	1		21
	IBD After Surgery	19	2		21
	IBS-D	22	1		23
	Microscopic Colitis	14	0		14
	Healthy subjects	11	0		11
Общо		99	21		120

Таблица 7-3. Докладване на кръв в изпражненията от пациентите в различните групи

			Asymptotic
Chi-Square test	Стойност	df	Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	52,879 ^a	10	,000
Likelihood Ratio	45,242	10	,000
Linear-by-Linear Association	6,008	1	,014
N of Valid Cases	120		

a. 11 cells (61,1%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,09.

Таблица 7-4. Chi-Square test за откриване на значимост между групите по отношение на наличие на кръв в изпражненията

При проведения анализ установихме същата зависимост на докладвани патологични примеси „слуз“ в изпражненията, както при докладването на кръв, данните са показани (Таблица 7-6). Регистрирахме сигнификантно по-голям брой на пациенти с IBS-D $n=11$ (47%) които са докладвали за слуз спрямо останалите групи и здравите контроли ($p = 0.001$). Резултатите от въпросника разгледахме за взаимовръзки с подлежаща придружаваща патология като автоимунни болести, хирургични операции, холецистектомия, тироидна патология, синдром на Рейно и захарен диабет, като открихме единствено сигнификантна разлика при пациентите след хирургични операции, главно IBD след резекция на илеум и J-pouch анастомоза (IPAA) ($p < 0.001$). При останалите изследвани фактори не открихме сигнификантна разлика и няма корелация между придружаващата патология и изследваните групи пациенти с IBD, МК и IBS-D ($p > 0.05$). Резултатите са описани подробно на (Таблица 7-5). Няма докладвана друга съществена ко-морбидност при изследваните групи пациенти.

Друга придружаваща патология		IBD Active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	HS	Общо, p - value
Хирургични операции, Лъчетерапия или Химиотерапия	1. Да	0	1	21	0	1	0	22, $p < 0.001$
	2. Не	30	20	0	23	13	11	97, $p < 0.001$
Холецистектомия	1. Да	0	2	0	2	0	0	4, $p = 0.215$
	2. Не	29	19	21	21	14	11	115, $p = 0.215$
Автоимунни заболявания	1. Да	1	2	5	2	2	0	12, $p = 0.187$
	2. Не	29	19	16	21	12	11	108, $p = 0.187$
Щитовидна патология (Нива на TSH)	1. Да	0	0	1	2	3	0	6, $p = 0.38$
	2. Не	30	21	19	21	11	11	113, $p = 0.38$
Захарен Диабет	1. Да	0	0	1	1	0	0	2, $p = 0.620$
	2. Не	30	21	20	22	14	11	118, $p = 0.620$
Синдром на Рейно	1. Да	1	1	1	2	0	0	5, $p = 0.798$
	2. Не	29	20	20	21	14	11	115, $p = 0.798$

Таблица 7-5. Сравнителна характеристика на допълнителна коморбидност между различните групи пациенти включени в анализа

При изследваните групи пациенти по отношение на прием на медикаменти, установяваме сигнификантна разлика в групата с МК по отношение на приема на не-стероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) и ИПП, като $n=7/14$ (50.0%) от пациентите с МК са приемали НСПВС, което е статистически значимо ($p < 0.001$) (виж. Таблица 7-14) (Таблица 7-15).

А инхибитори на протонната помпа (ИПП) са приемали отново пациенти с МК n=12/14 (85%), което се различава от приема на ИПП сред останалите групи пациенти ($p < 0.001$) (виж. Таблица 7-16) (Таблица 7-17). При анализа на групата на антихипертензивните медикаменти, установихме прием на сартани само при n=2/14 от всичките болни и те бяха в групата на МК, което статистически значимо ($p = 0.009$) (Таблица 7-8).

Слуз в изхожданията				
Брой				
		Слуз в изхожданията		Общо
		Не	Да	
Групи пациенти	IBD - Active	11	19	30
	IBD in Remission	15	6	21
	IBD After Surgery	13	8	21
	IBS-D	12	11	23
	Microscopic Colitis	10	4	14
	Healthy subjects (HS)	11	0	11
Общо		72	48	120

Таблица 7-6. Брой на пациентите докладвали за слуз в изпражненията при различните групи пациенти

Chi-Square Tests			
	Стойност	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	16,662 ^a	5	.005
Likelihood Ratio	20,463	5	.001
Linear-by-Linear Association	8,893	1	.003
N of Valid Cases	120		

a. 1 cells (8,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,40.

Таблица 7-7. Chi-Square тест за слуз в изхожданията

Дескриптивно Фактори Прием на медикаменти		IBD Active	IBD remission	in	IBD after surgery	IBS-D	MC	HS	Общо
Прием на НСПВС	1. Да	1	0		0	1	7	0	9
	2. Не	29	21		21	22	7	11	111
Прием на ИПШ	1. Да	2	0		2	6	12	0	23
	2. Не	28	21		19	17	2	11	97
Прием на Сартани	1. Да	0	0		0	0	2	0	2
	2. Не	30	21		21	23	12	11	118
Прием на Лаксативи	1. Да	0	0		0	0	0	0	0
	2. Не	30	21		21	23	14	11	120
Таблица 7-8. Дескриптивна статистика на докладвания приема на медикаменти при различните групи пациенти.									

Спрямо двете категории „функционално” или органично заболяване, след провеждане на пълния диагностичен алгоритъм (Фигура 14), се установява значително по-голям процент пациенти с органично заболяване в сравнение с пациенти страдащи от функционални заболявания на червата с диария при нашата кохорта 86/109 (78.8%) срещу 23/109 (21.2%) ($p < 0.001$).

7.1.2 Микробиологично и паразитологично изследване на фецес

При всички пациенти участващи в проучване бяха извършени микробиологични (копрокултура) на фецес и отделна проба беше изпратена за паразитологично изследване на фецес, като в нито една от групите не установихме патологични отклонения и всички пациенти бяха отрицателни

за Cl. Diff (Ag and Toxin A/B) или хелминтози (протозои) ($p > 0.05$) (**Таблица 7-9.**)

Патогени във фецес			
Брой			
		Патогени във фецес	
		Негативни	Общо
Групи	IBD - Active	30	30
	IBD in Remission	21	21
	IBD After Surgery	21	21
	IBS-D	23	23
	Microscopic Colitis	14	14
	Healthy subjects	11	11
Общо		120	120

Таблица 7-9. Копрокултура (фецес) микробиология при всички пациенти

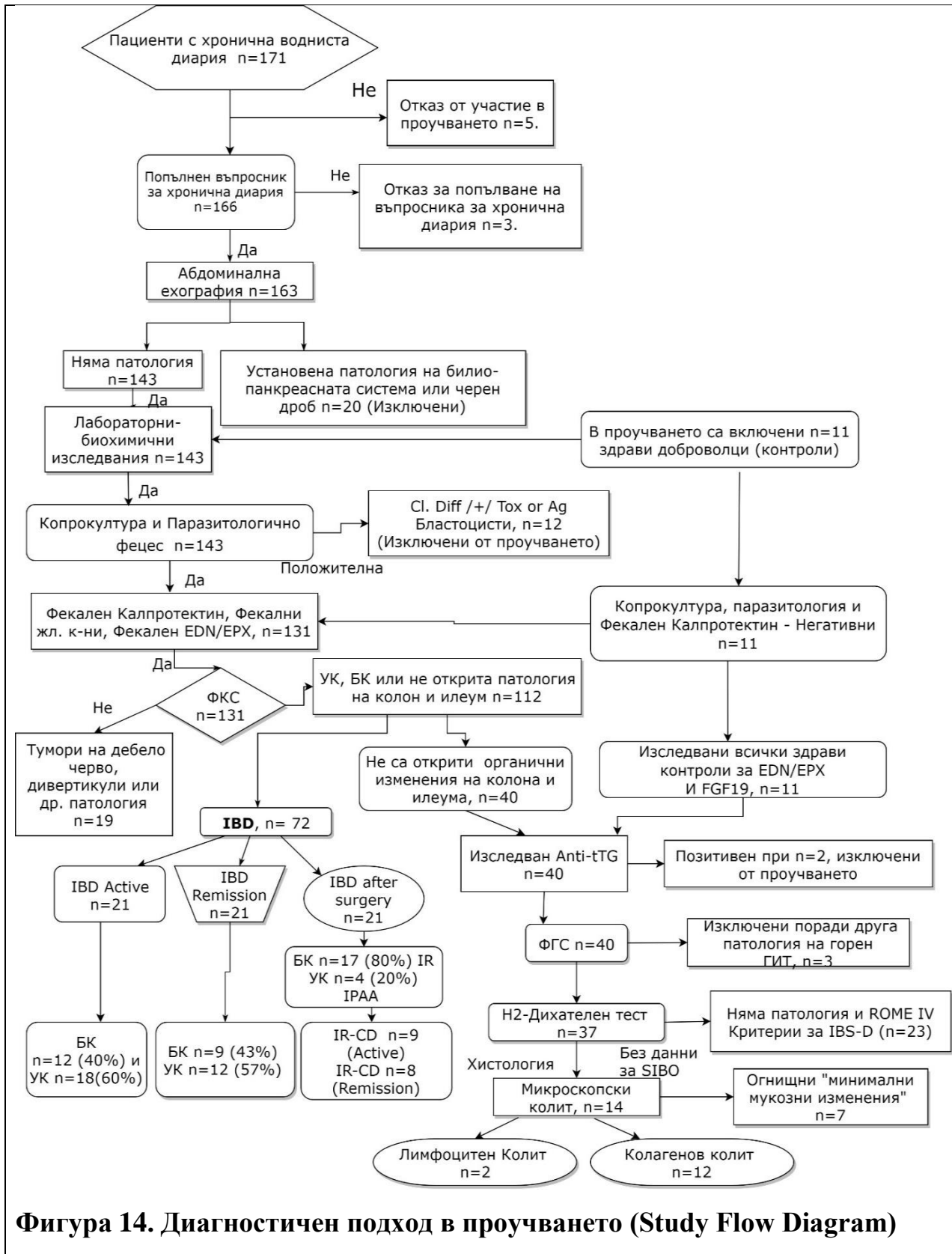
Паразити във фецес			
Брой			
		Stool Parasites	
		Негативни	Общо
Групи	IBD - Active	30	30
	IBD in Remission	21	21
	IBD After Surgery	21	21
	IBS-D	23	23
	Microscopic Colitis	14	14
	Healthy subjects	11	11
Общ брой		120	120

Таблица 7-10. Паразитологично изследване на фецес при всички пациенти

7.1.3 Алгоритъм за пациенти с хронична диария

Подробен диагностичен алгоритъм при всички пациенти постъпващи с неясна хронична водниста диария е разработен от колектива на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и представен на

Фигура 30 (виж секция ПРИНОСИ). За текущото проучване при нашите 109 пациента изследвани в Клиниката по Гастроентерология за диагностично уточняване на хронична диария и 11 здрави контроли сме представили подробен диагностичен подход до достигането на диагнозите и използваните от нас диагностични средства на **Фигура 14. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)**. За целта при всички пациенти се проведе анкетно проучване с текущия въпросник (**Таблица 6-1. Анкетна карта (въпросник) за пациенти с хронична диария**) на симптомите, копрокултури и паразитологични изследвания, след което проведохме неинвазивни фекални биомаркери за определяне на интестиналното възпаление на болните, абдоминална ехография, серологични изследвания и пристъпихме към ендоскопските изследвания с хистологична верификация за поставяне на диагнозата и сравнение на получените резултати от биомаркерите с установените стандартни изследвания. При текущото проучване нямаше нито един летален изход и не се установиха никакви странични ефекти от проведените диагностични процедури.



Фигура 14. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)

7.2 Микроскопски колит (МК)

След като проведохме илеоколоноскопия при $n=14/109$ (12.8%) се откриват огнищни „неспецифични“ макроскопски изменения (ерозии, лесна ранимост, оток) по време на илеоколоноскопията без да има предварително поставена диагноза ХВЧЗ. При $n=23/109$ (21%) от пациентите не се откриха никакви ендоскопски изменения. При всички тези $n=37$ пациента, които нямат ендоскопски характеристики на IBD, бяха проведени биопсии от терминален илеум, множествени етажни биопсии на всички сегменти на дебелото черво и ректума (виж. **Протокол за вземане на биопсии при микроскопски колит стр.99**), като при $n=14$ (12.8%) от тези пациенти беше поставена диагнозата микроскопски колит (МК) от двама независими патоанатоми. От тези $n=14$, с лимфоцитен колит (ЛЛ) бяха диагностицирани $n=2$ (14%), докато $n=12$ (86%) са с колагенов колит (КК), като бяха спазени критериите за диагноза определени от Европейската Асоциация по патология и EMCG group [25][23]. От тези $n=14$ пациента, ендоскопски макроскопски изменения в терминалния илеум установихме при $n=2$ (14%) пациента. При $n=5$ (35%) от пациентите открихме макроскопски ендоскопски изменения по хода на дебелото черво. При останалите $7/109$ с огнищни „минимални изменения“ в колона и $16/109$ без промени не покриха хистологичните критерии за МК и бяха включени в групата на IBS-D. Средната възраст на пациентите с МК беше $60.3г. \pm 17.4г.$, като половото разпределение е значително в полза на жените с $n=11$ (78%) и $n=3$ (22%) за мъже с МК, за сравнение намерихме равномерно разпределение на жени и мъже в другите групи пациенти и здравите контроли. Средната възраст на

пациентите с МК е сигнификантно по-висока спрямо останалите групи и се установява статистическа значимост ($p < 0.001$).

7.2.1 Дескриптивна статистика на МК

В групата с хистологично доказан МК установихме сигнификантно завишени средни стойности на ФКП $221\mu\text{g/g}$, което е по-високо от средното ниво на ФКП при здрави контроли и IBS-D групата ($p = 0.047$) (Таблица 7-11) и (Таблица 7-12).

Маркери на чревно възпаление и МЖК	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
CRP, mean \pm SD	1.260a \pm 2.47	0.323a,b \pm 0.23	0.436a,b \pm 0.35	0.189b \pm 0.16	0.551a,b \pm 0.35	0.310a,b \pm 0.28	$p = 0.031$
Фекален Калпротектин, mean \pm SD	750a \pm 465	81b \pm 39	375.000c \pm 264	47.b \pm 38	221b,c \pm 279	43b \pm 23	$p < 0.001$
Фекални жлъчни к-ни, mean \pm SD	42.000a \pm 19.453	37.576a \pm 14.135	40.195a \pm 20.955	40.882a \pm 20.363	40.627a \pm 25.42	44.072a \pm 13.386	$p = 0.315$
FGF19, median (25-75th percentile)	0.009 (0.005-211.406)	0.009 (0.005-78.142)	0.005 (0.002-0.012)	266.900 (78.142-831.000)	0.010 (0.004-78.142)	463.000 (50.080-858.000)	$p < 0.001$

Таблица 7-11. Маркери на интестинално възпаление и биомаркери за МЖК при МК.

Variables	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
Брой на пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	$p = 0.435$
Пол, жена (%)	13 (43)	9 (43)	9 (43)	13 (57)	11 (78)	5 (45)	$p = 0.265$
Bristol stool form scale, mean \pm SD	6.23 \pm 1.00	5.57 \pm 1.02	6.29 \pm 0.956	6.35 \pm 0.885	6.71 \pm 0.469	4.00 \pm 0.447	$p < 0.001$
Stool Index (SI), mean \pm SD	49a,b \pm 21	33a,c \pm 13	58b \pm 23	31c \pm 18	63b,d \pm 25	6e \pm 3	$p < 0.001$
Честота на дефекации/дн, mean \pm SD	8a,b \pm 3	6a,c \pm 2	9b \pm 3	5c \pm 2	9b,d \pm 3	1e \pm 1	$p < 0.001$
Продължителност на диария (седмици), median (25-75th percentile)	5 (4-6)	4 (4-5)	6 (4-7)	5 (5-6)	6 (6-15)	0(0)	$p < 0.001$
Дефекации през ноща, n (%)	16a (53.3)	4a,b (19)	10a (47)	2b (8.7)	9a (64)	0 (0)	$p < 0.001$
Диария по време на гладуване n (%)	12a (40)	5a (23)	11a (52)	5a (21)	6a (42.9)	0(0)	$p = 0.029$
ROME IV, n (%)	9a,c (30)	2a (9.5)	6a,c (28.6)	23b (100)	10b,c (71.4)	0(0)	$p < 0.001$
Таблица 7-12. Дискриптивна статистика свързана с диаричните изхождания на пациентите с МК и останалите групи							

При всички пациенти с МК бяха проведени Н2-дихателни тестове с лактулоза (n=14) като само при n=3 пациента се установи скъсено ороекално транзитно време и не установихме статистическа значимост в тази група пациенти спрямо тези с IBD ($p = 0.584$).

На (Таблица 7-12) представяме клиничните характеристики на диаричния синдром при МК, като се установихме, че средният брой на изхождания дневно е 9/дн. ± 3 , като SI е 63 ± 25 , броят пациентите с изхождания по време на нощта е $n=9/14$ (64%), което е статистически значимо ($p < 0.001$). Установихме, че $n=10$ (71.4%) от пациентите с МК отговарят на ROME IV критериите за IBS-D, което в повечето случаи може да ги постави в друга графа и тези пациенти да не бъдат правилно диагностицирани. Няма сигнификантна разлика в другите изследвани показатели при МК.

Сравнихме допълнителни субективни показатели за общото състояние свързани с консумацията на тегло (редукция на кг.), отпадналост (слабост), промяна в диетата, слюз в изхождания и кръв в изхождания, които са докладвани от пациентите посредством анкетата за хронична диария (Таблица 6-1). От получените резултати установихме, че 50% от пациентите с IBS-D и МК докладват за загуба на повече от 5кг през последните 2 месеца ($p = 0.025$). От резултатите става ясно, че от отпадналост и лесна умора са се оплаквали $n=16/23$ (70%) от IBS-D пациентите и $n=10/14$ (71%) от пациентите с МК ($p = 0.002$). Няма сигнификантна разлика между различните групи пациенти по отношение на промяна в диетата през последния месец преди изследването ($p = 0.055$). Пациентите с МК не са докладвали примеси на кръв и слюз в изхожданията. Всички резултати са представени на (Таблица 7-13).

Допълнителни показатели за общо състояние		IBD Active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	HS	Общо p value
Загуба на килограми	1. Да	12	4	8	12	7	0	43, $p = 0.025$
	2. Не	18	17	13	11	7	11	77, $p = 0.025$
Умора (Слабост)	1. Да	19	10	14	16	10	0	69, $p = 0.002$
	2. Не	11	11	7	7	4	11	51, $p = 0.002$
Промяна в диетичния режим	1. Да	7	3	0	7	3	0	7, $p = 0.055$
	2. Не	23	18	21	16	11	11	100, $p = 0.055$
Кръв във фецес	1. Да	17	1	2	1	0	0	21, $p < 0.001$
	2. Не	13	20	19	22	14	10	98, $p < 0.001$
Слуз във фецес	1. Да	19	6	8	11	4	0	48, $p = 0.005$
	2. Не	11	15	13	12	10	11	72, $p = 0.005$

Таблица 7-13. Дискриптивни данни за МК спрямо другите групи по отношение за показатели за общо състояние

Според анкетното проучване не установихме наличие на различна докладвана придружаваща патология при пациентите с хронична диария, която патология да имат статистически значима връзка или корелация с изследваните заболявания ($p > 0.05$) (виж Таблица 7-5).

7.2.2 МК и прием на медикаменти (НСВПС, Сартани, ППИ)

При обработването на данните установихме, че $n=9/109$ (8.2%) от всички пациентите са приемали нестероидни противовъзпалителни средства

(НСПВС), като $n=7/9$ (77.7%) са диагностицирани с МК, което е статистически значимо ($p < 0.001$) (виж. Таблица 7-14) (Таблица 7-15).

Прием на НСПВС	Групи						total
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	HS	
Не	29	21	21	22	7	11	111
Да	1	0	0	1	7	0	9
Общо	30	21	21	23	14	11	120

Таблица 7-14. Прием на НСПВС сред изследваната популация.

Chi-Square Test	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	41,828 ^a	5	,000
Likelihood Ratio	27,529	5	,000
Linear-by-Linear Association	7,315	1	,007
N of Valid Cases	120		

a. 6 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,83.

Таблица 7-15. Chi-Square test за значима връзка между приема на НСПВС и МК

От всички изследвани $n=120$, общо $n=23$ пациента са приемали ИПП. Установихме сигнификантна разлика в приема на инхибитори на протонната помпа (ИПП) сред пациентите с МК $n=12/14$ (85%), което се различава от приема на ИПП сред останалите групи пациенти, като $n=12$ от общо $n=23$ пациенти с МК са приемали ИПП ($p < 0.001$) (виж. Таблица 7-16) (Таблица 7-17).

Прием на ИПШ	Groups						Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	Microscopic Colitis	Healthy subjects	
Не	28	21	19	17	2	11	97
Да	2	0	2	6	12	0	23
Общо	30	21	21	23	14	11	120

Таблица 7-16. Прием на ИПШ сред изследваната популация

Chi-Square Tests	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	50,715 ^a	5	,000
Likelihood Ratio	44,779	5	,000
Linear-by-Linear Association	16,216	1	,000
N of Valid Cases	120		

a. 5 cells (41,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,11.

Таблица 7-17. Chi-Square test за значимост при приема на ИПШ сред изследваните групи

Chi-Square Tests	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Sartan intake			
Pearson Chi-Square	15,400 ^a	5	,009
Likelihood Ratio	8,861	5	,115
Linear-by-Linear Association	2,960	1	,085
N of Valid Cases	120		

a. 6 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,18.

Таблица 7-18. Прием на Сартани сред МК и взаимовръзката с другите групи

В групата с МК установихме, че $n=2/14$ (14%) са докладвали за прием на анти-хипертензивната група медикаменти „сартани“, което е

статистически значимо спрямо останалите групи, които не са докладвали никакъв прием на сартани ($p = 0.009$) (виж. **Таблица 7-18**). В проведеното проучване нито един от изследваните пациенти не е приемал лаксативи (100%).

7.2.3 Тютюнопушене, холецистектомия и CRP при МК

От получените резултати не установихме сигнификантна разлика в тютюнопушенето сред изследваните групи и не открихме разлика между групите бивши пушачи, не-пушачи и пушачи ($p = 0.442$) (**Таблица 7-19**). Не открихме и статистичка значима връзка между пациентите с МК и тези, които са били холецистектомирани ($p = 0.145$). Средните стойности CRP при пациенти с МК бяха 0.55 mg/dl, което не показва статистическа разлика между здравите контроли ($p = 0.070$).

Тютюнопушене	Групи						Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	HS	
Никога не пушили	23	16	14	16	9	11	89
Предишни пушачи	1	1	0	1	0	0	3
Активни пушачи	6	4	7	6	5	0	28
Общо	30	21	21	23	14	11	120

Таблица 7-19. Тютюнопушене сред всички групи пациенти. Няма статистически значима разлика Chi-square test ($p = 0.442$)

7.2.4 Ендоскопски изменения при МК

Илеоколоноскопия Ендоскопски изменения	Групи					Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	
Нормална Ендоскоп. находка	0	0	0	16	7	23
Минимални мукозни изменения terminal ileum (follicular reaction)	0	0	0	3	2	5
Minimal mucosal findings in large bowel - erosions, innecktion, fragile mucosal	0	0	0	4	5	9
Crohn's after resection in terminal ileum (Right Hemicolectomy)	0	0	17	0	0	17
Crohn's L1	8	8	0	0	0	16
Crohn's L2 or L3	4	1	0	0	0	5
Ulcerative colitis Active	18	0	0	0	0	18
Ulcerative colitis in remmision	0	12	0	0	0	12
Ulcerative Colitis after Surgery (J-Pouch)	0	0	4	0	0	4
Общо	30	21	21	23	14	109

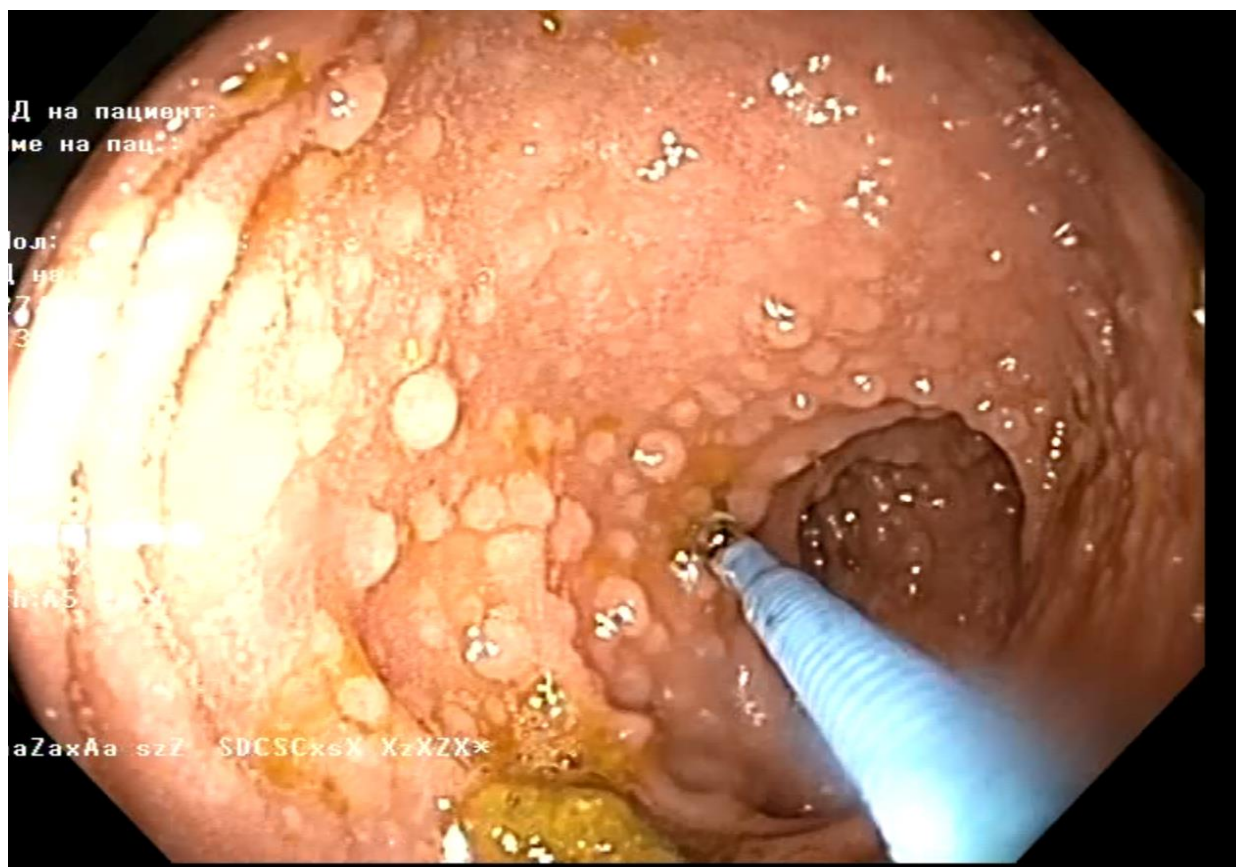
Таблица 7-20. Дескриптивни данни за ендоскопските изменения открити при различните групи пациенти

На (Таблица 7-20) са представени резултатите от илеоколоноскопията и откритите изменения, като ние установихме, че нормална илеоколоноскопия има при $n=23/109$ (21%) от изследваните пациенти. В групата с МК установихме при $n=2/14$ (15%) огнищни „минимални“ изменения в терминалния илеум. При $n=5/14$ (35%) от пациентите с МК установихме огнищни минимални лигавични изменения по хода на дебелото черво (огнищни ерозии, инекция, лесно ранима лигавица и субмукозни хеморагии). Или общо при $n=7/14$ (50%) от пациентите с МК наблюдавахме мукозни изменения, които са биопсирани и статистически резултатите показват сигнификантна разлика между ендоскопските изменения при МК и останалите групи пациенти ($p < 0.001$) (виж. Таблица 7-21).

Chi-Square test за ендоскопските изменения	Стойност	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	289,792 ^a	32	,000
Likelihood Ratio	270,228	32	,000
Linear-by-Linear Association	66,016	1	,000
N of Valid Cases	109		

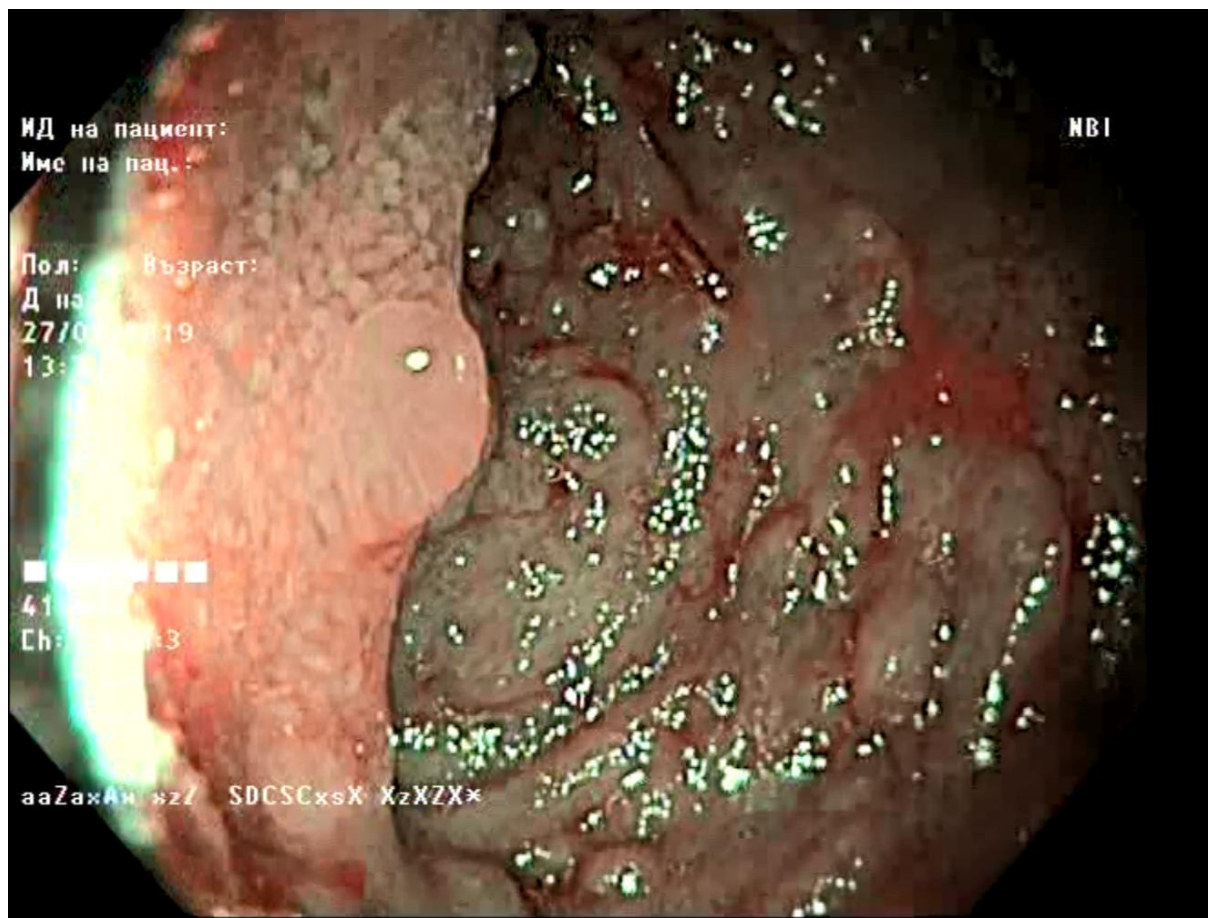
a. 44 cells (97,8%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,51.

Таблица 7-21. Chi-square test за взаимовръзка между ендоскопските изменения при различните групи пациенти.



Фигура 15. Лимфоликуларна реакция в терминалния илеум на пациент с КК и вземане на биопсия.

Ендоскопски образ от терминален илеум при пациенти с КК (Фигура 15).

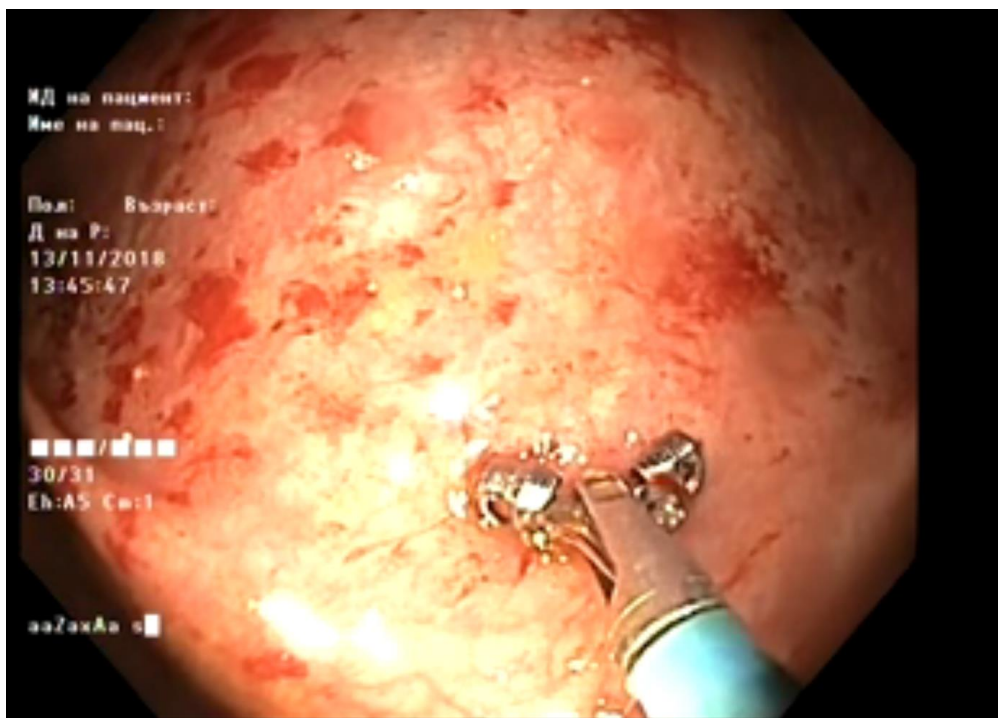


Фигура 16. Фоликул в терминален илеум чрез използването на NBI и разграничаване на покривния тънкочревен епител

На (Фигура 16) се установяват минимални хиперпластични фоликули в терминалния илеум при един от пациентите с доказан хистологично МК. Видяха се ясно разграничими лимфни фоликули чрез използването на narrow band imaging (NBI). При 7 пациентите с МК се установи лесна ранимост на лигавицата по време на вземане на биопсия и неспецифични ендоскопски изменения, които се биопсираха (Фигура 17) и (Фигура 18). Чрез използването на ендоскоп с високо резолюция и NBI успяхме да верифицираме и класифицираме тези изменения по-точно, както и „таргтено“ да биопсираме тези лезии в дебелото черво и терминалния илеум.



Фигура 17. Огнищни минимални мукозни изменения по лигавицата на дебелото черво при пациент с ЛК чрез използването на NBI.



Фигура 18. Мукозни изменения при КК (хеморагии, ерозии, ранимост)

7.2.5 Хистологични резултати от биопсия на дебело черво

Използвахме хистологична оценка от двама независими патологоанатоми на хистологичните препарати с МК и на тези с диагнозата IBS-D, като установихме завишен брой на интраепителни лимфоцити (IEL) само при $n=2/38$ (5%) от изследваните пациенти (виж. **Таблица 7-23**). Средните стойности на IEL при всички $n=14$ пациента с МК са 11.36/бр./зп спрямо тези с IBS-D 6.93/бр./зп, като броя на IEL при МК варира от 3-35 IEL/зп, но не се установява статистическа значима разлика между групите ($p = 0.645$) (**Таблица 7-23**) (**Таблица 7-24**).

Брой на Лимфоцити в мукозата						
Брой лимфоцити						
Групи	Mean	N	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Median
IBS-D	6,96	23	3,198	2	15	7,00
Microscopic Colitis	11,36	14	8,317	3	35	10,00
Total	8,71	38	5,936	2	35	8,00

Таблица 7-22. Средни стойности на IEL при МК и IBS-D от хистологичен резултат.

Разпределение на броя на интраепителните лимфоцити														
Брой														
Групи	Брой лимфоцити													Общо
	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	15	23	35	
IBS-D	1	2	2	3	3	3	5	0	1	2	1	0	0	23
МК	0	1	1	1	0	0	3	3	1	2	0	1	1	14
Общо	1	3	3	4	3	3	8	3	2	5	1	1	1	38

Таблица 7-23. Разпределение на всички пациенти изследвани и преброени IEL в хистология от дебело черво.

Не открихме статистическа значима разлика между броя на IEL в мукозата и броя на периферните лимфоцити в серума при МК или при другите групи пациенти ($p = 0.704$). Няма и сигнификантна разлика между броя на лимфоцити в периферна кръв между различните групи ($p = 0.804$).

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	20,893 ^a	24	,645
Likelihood Ratio	22,287	24	,562
Linear-by-Linear Association	1,058	1	,304
N of Valid Cases	38		
a. 39 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,03.			

Таблица 7-24. Chi-Square test за зависимост между IEL и МК с другите групи.

Средни стойности на колагеновия слой при МК и IBS-D						
Колагенов слой в μm						
Групи	Mean	N	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Median
IBS-D	2,35	23	,714	1	3	2,00
Microscopic Colitis	16,00	14	9,030	2	37	15,00
Общо	7,37	38	8,578	1	37	3,00

Таблица 7-25. Средни стойности на колагенов слой при МК и IBS-D

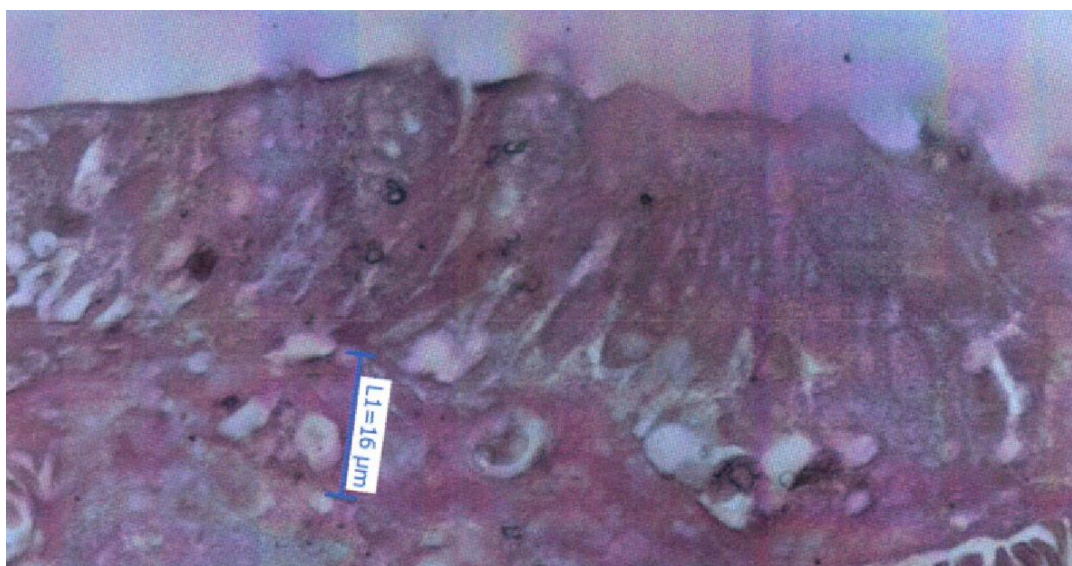
Измерването на дебелината на колагеновия слой е извършено с окуляр микрометър при което патолозите докладваха при $n=12/14$ (85%) от пациентите с МК увеличен колагенов слой. Те бяха класифицирани като МК. Средната стойност на размера на колагеновия слой беше $16\mu\text{m}$ при МК, докато при IBS-D средният размер на колагеновия слой е $2.35\mu\text{m}$, като се установява значителна статистическа разлика между двете групи ($p = 0.033$) (Таблица 7-25)(Таблица 7-26).

Дебелината на колагеновия слой в цялата група МК варира от $2-37\mu\text{m}$, при IBS-D пациентите дебелината на колагеновия варира между $1-3\mu\text{m}$, което статистически значима разлика ($p = 0.001$).

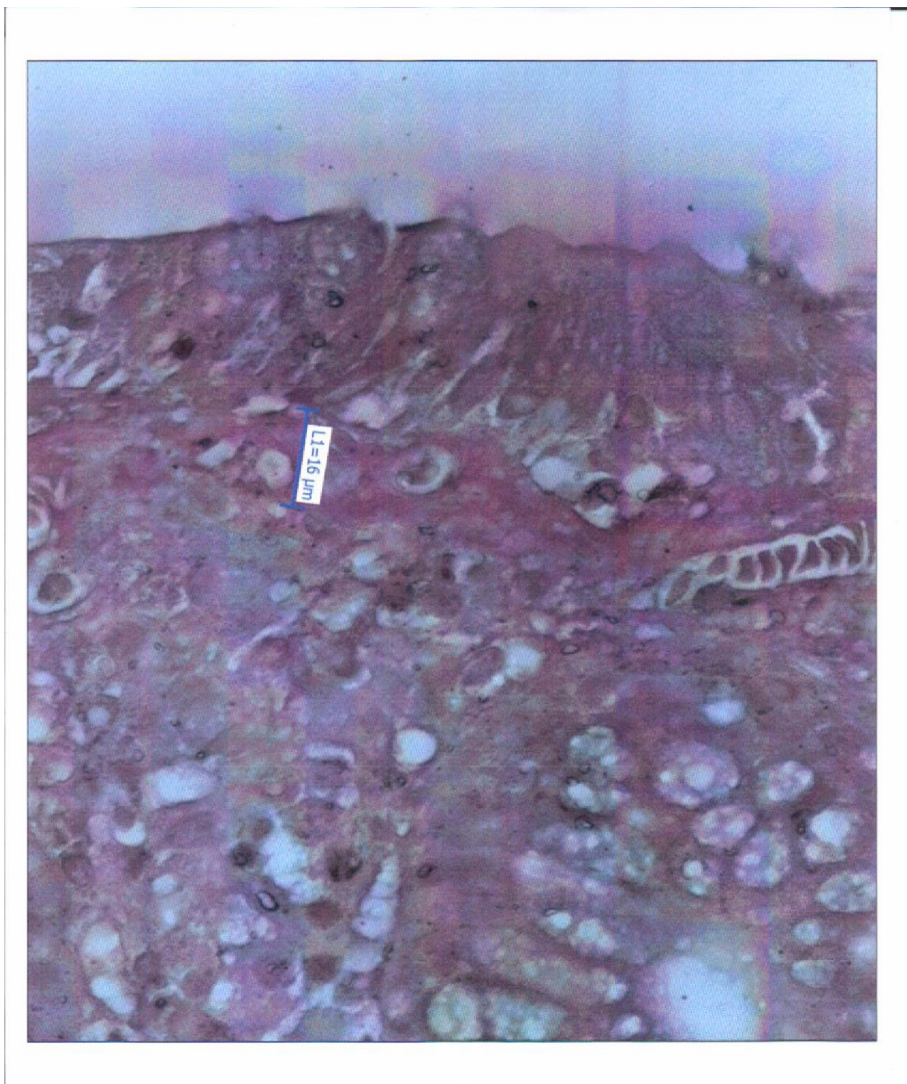
Разпределение на дебелината на колагеновия слой при МК и IBS-D															
Групи	Колагенов слой в μm													Total	
	1	2	3	10	11	12	14	16	20	21	22	24	37		
IBS-D	3	9	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
MC	0	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	14
Total	3	11	12	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	38

Таблица 7-26. Размера на колагеновия слой при всички изследвани пациенти с МК и IBS-D

На (Фигура 19) и (Фигура 20) е представен снимков материал от измерването на дебелината на колагения слой при един от нашите пациенти включен в проучването (предоставен благодарение на Д-р Терзиев).



Фигура 19. Хистологичен препарат от КК и измерената дебелината на колагеновия слой.



Фигура 20. Хистологичен препарат Н&Е при КК и измерване на дебелината на колагеновия слой

При проведените статистически тестове не се установи корелация между дебелината на субепителния колагенов слой и броя на IEL в мукозата (Pearson Chi-Square, Spearman Correlation $p = 0.967$). Установихме, че между дебелината на колагеновия слой в μm и SI (броя на изхожданията дневно) се установява силна корелационна връзка и зависимост, която се засилва със задебеляването подепителния колагенов слой (Pearson Correlation, $r = 0.664$, $p < 0.001$) ($r = 0.606$, $p < 0.001$) (виж. Таблица 7-27).

Корелации			
		Колагенов слой в μm	Честота на дефекации
Колагенов слой в μm	Pearson Correlation	1	,665**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	38	38
Честота на дефекации/дн	Pearson Correlation	,665**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	38	120
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).			
Таблица 7-27. Корелация между дебелината колагеновия слой и броя на изхожданията дневно при МК			

Не установихме никаква зависимост или корелация между броя на интраепителните лимфоцити (IEL) и между броя на лимфоцитите в серума ($r = 0.124$, $p = 0.459$). Не открихме взаимовръзка между броя на периферните еозинофили с броя на лимфоцитите, дебелината на колагеновия слой измежду всички групи ($p = 0.809$). Пациентите с IBS-D нямат увеличен брой IEL лимфоцити в мукозата и няма налична взаимовръзка с другите групи или сравнено с МК ($p = 0.645$)

7.2.6 Горно-ендоскопско изследване (ФГС) при МК

При всички пациенти с МК беше осъществено горно-ендоскопско изследване (ФГС) с вземане на биопсия от дуоденума, на което изследване се установи $n=10/14$ (71%) нормална ендоскопска находка. При $n=4/14$ (29%) се изразяват ендоскопски съмнения за атрофия на лигавицата на дуоденума, които данни са представени на (Таблица 7-28). Не установихме статистическа значима разлика между различните групи пациенти и резултатите от ендоскопския протоколи при другите групи ($p = 0.063$) (виж Таблица 7-29).

Гастроскопия	GROUPS						Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	
Нормална	14	12	18	13	10	4	71
Атрофична лигавица	6	0	0	9	4	0	19
Болест на Крон	1	0	0	1	0	0	2
Мукозни промени	0	1	0	0	0	0	1
Общо	21	13	18	23	14	4	93

Таблица 7-28. Резултати от горно-ендоскопските протоколи при всички групи пациенти

Chi-Square Tests	Стойност	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	24,145 ^a	15	,063
Likelihood Ratio	28,830	15	,017
Linear-by-Linear Association	,076	1	,783
N of Valid Cases	93		

a. 19 cells (79,2%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,04.

Таблица 7-29. Не се установява статистическа взаимовръзка между резултатите от различните ендоскопски протоколи между различни групи изследвани пациенти

7.2.7 Хистологични резултати от дуоденална биопсия при МК

При хистологичните резултати от дуоденалните биопсии на пациентите с МК установихме, че при n=8/14 (57%) има нормална хистологична картина от биопсиите в дуоденума. При n=5/14 (35%) се описва наличие на начална парциална атрофия на лигавицата на

дуоденума, но от неспецифичен тип, различен от глутенова ентеропатия ($p = 0.004$). При $n=1/14$ (7%) се намира интраепителна лимфоцитоза в биопсиите в дуоденума. При нито един (0%) от пациентите не установихме задебелен субепителен колагенов слой в лигавицата на дуоденума при пациентите с МК (виж. **Таблица 7-30**). Последващи диагностични процедури и по-голям брой биопсии ще са нужни от дуоденума и дебелото черво за да се направят по-точни заключения за причината на атрофията в дуоденума.

Хистология от биопсии в дуоденума	Групи						Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	
Норма	14	12	18	8	8	4	64
Вилозна атрофия	6	0	0	12	5	0	23
Лимфоцити	0	1	0	3	1	0	5
Колагенов слой	1	0	0	0	0	0	1
Общо	21	13	18	23	14	4	93

Таблица 7-30. Хистологичните резултати от ФГС на всички групи пациенти

Chi-Square Tests	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	33,248 ^a	15	,004
Likelihood Ratio	41,613	15	,000
Linear-by-Linear Association	,457	1	,499
N of Valid Cases	93		

a. 17 cells (70,8%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,04.

Таблица 7-31. Статистически значима взаимовръзка между хистологичните резултати при различните групи пациенти от дуоденална биопсия на МК (Chi-Square test).

7.3 Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) и фекални жлъчни киселини (TFFBA)

За да определим диагностичната стойност на FGF19 и TFFBA, като биомаркери за МЖК при ХВЗЧ и МК, използвахме група от 109 последователни пациенти с хронична водниста диария, разпределение по диагнози с БК (n=38), с УК (n=34), с МК (n=14), с IBS-D (n=23) и ги сравнихме с 11 здрави контроли. От тези пациенти с БК, n=17 бяха в клинична и ендоскопска ремисия, а n=21 в ендоскопска активност. От тези БК (n=38), с резекция на терминалния илеум (IR-CD) са n=17 (44.7%), от които n=8 (21.5%) са в клинична и ендоскопска ремисия (Rutgeerts score: i0 и i1). В клинична и ендоскопска активност с БК след резекция IR-CD установихме рецидив при n=9 (23.5%), верифициран с повече от 5 афтоидни язви (Rutgeerts score: \geq i2). Без резекция в ремисия NR-CD (Remission) са n=9 (23.5%). Пациентите с БК без резекция (NR-CD) в активност са n=12 (31.5%). При пациентите с УК в ендоскопска ремисия бяха n=12 (35.2%), като останалите n=22 (65.8%) бяха в ендоскопска активност. От тези n=22, n=4 пациента бях след ИРАА в активност (паучит) според ендоскопските протоколи и стойностите на ФКП.

За оценката на биомаркерите за МЖК, пациентите бяха разделени в **група 1** (IBD Active) n=30, **група 2** (IBD in remission) n=21, **група 3** (IBD after surgery) n=21, **група 4** (IBS-D) n=23, **група 5** (МК) n=14 и **група 6** (Здрави доброволци) n=11. Данните от дескриптивната статистика на стойностите на FGF19 и TFFBA при всичките групи са представени (**Таблица 7-32**), като са сравнени със стандартните маркери на възпаление (CRP и ФКП), както и спрямо демографските показатели (пол, възраст).

	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value между висчки групи
Брой пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	$p = 0.435$
Пол, Жени (%)	13 (43)	9 (43)	9 (43)	13 (57)	11 (78)	5 (45)	$p = 0.265$
Години, mean \pm SD	45a \pm 13	50a,b \pm 15	48a,b \pm 17	46a,b \pm 15	60b \pm 17	41a \pm 17	$p = 0.117$
CRP, mean \pm SD	1.260a \pm 2.47	0.323a,b \pm 0.23	0.436a,b \pm 0.35	0.189b \pm 0.16	0.551a, b \pm 0.35	0.310a,b \pm 0.28	$p = 0.031$
Фекален Калпротектин, mean \pm SD	750.933a \pm 465.994	81.333b \pm 39.701	375.000c \pm 264.531	47.513b \pm 38.125	221.285 b,c \pm 279.933	43.090b \pm 23.197	$p < 0.001$
Фекални жл. К-ни, mean \pm SD	42.000a \pm 19.453	37.576a \pm 14.135	40.195a \pm 20.955	40.882a \pm 20.363	40.627a \pm 25.42	44.072a \pm 13.386	$p = 0.315$
FGF19, median (25-75th percentile)	0.009 (0.005-211.406)	0.009 (0.005-78.142)	0.005 (0.002-0.012)	266.900 (78.142-831.000)	0.010 (0.004-78.142)	463.000 (50.080-858.000)	$p < 0.001$
FGF19 (mean \pm SD)	263.57 \pm 582.22	367.21 \pm 778.60	57.10 \pm 233.99	447.55 \pm 421.24	403.67 \pm 1173.69	585.65 \pm 579.72	$p=0.001$

Таблица 7-32. Дискриптивна статистика на резултатите на FGF19 и TFFBA в различните групи пациенти

При изследваните взаимовръзки установяваме сигнификантна разлика в средните стойностите на FGF19, между различните групи, като в групата IBD (Active) стойностите са двойно по-ниски от тези при здрави доброволци ($p = 0.001$). При групата с IBD в ремисия и необяснима

хронична диария установяваме средни стойности от 367.21 pg/ml, което е значима разлика със стойностите на здравите доброволци 585.65 pg/ml ($p = 0.001$). Най-голяма сигнификантна разлика установяваме при групата IBD след хирургична резекция със средни стойности на FGF19 от 57.10 pg/ml., като стойностите са 5 пъти по-ниски от тези на здравите контроли и 2 пъти по-ниски от тези на IBD active ($p < 0.001$). При оценяването на средните стойности на FGF19 в групата IBS-D, който са 447.55 pg/ml., установихме, че няма сигнификантна разлика със здравите контроли ($p = 0.871$). Няма сигнификантна разлика и между IBS-D и групата на МК ($p = 0.895$). Обаче, значима връзка установяваме между логаритмичните средните стойности (median) на FGF19 в групата с МК спрямо здравите контроли ($p = 0.021$), защото това не са нормално разпределени стойности.

В проучването на пациентите с хронична диария намерихме сигнификантна връзка между стойностите на FGF19 (not normal distributed data) изразени в медиана (median) и 25-75 перцентил между различните групи, като при IBD Active, IBD remission с хронична необяснима диария, IBD след хирургия и МК установяваме стойности около 0.009 ($p < 0.001$). При групата с IBS-D и в групата със здравите контроли установяваме значителна разлика в стойностите по медиана и 25-75 перцентил спрямо другите 4-ри групи ($p < 0.001$).

При изследваните фекални жлъчни киселини (TFFBA) не открихме значима разлика между стойностите в различните групи и спрямо всяка отделна група сравнена със здравите контроли ($p = 0.315$). При проведените анализи *не се установи статистическа взаимовръзка между стойностите на FGF19 и фекалните жлъчните киселини* ($p = 0.219$). Изследваните стойности на CRP и ФКП, показаха значими разлики между групите с IBD, МК и тези IBS-D ($p = 0.031$, $p < 0.001$), като взаимовръзката с FGF19 беше използвана за да се отграничат пациентите с чревно възпаление.

7.3.1 Определяне на чувствителността и специфичността на FGF19 за откриване на МЖК при IBD и МК

При всичките пациенти с хронична диария в нашата кохорта, определихме най-високата прагови стойност (cut-off) на FGF19 ≤ 136.7 pg/mL. за откриване на МЖК. При получените резултати открихме, че FGF19 има обща диагностична точност с чувствителност от 72.7% и специфичност от 72.4% за откриване на МЖК при пациенти с хронична диария. При тези използвани прагови стойности (cut-off) определихме, че 65 от 109 пациента (59.6%) имат ниски стойности на FGF19 и съответно МЖК, докато 44 пациента (40.4%) нямат МЖК спрямо стойностите на здравите контроли в това проучване. На (Таблица 7-33) представяме данни на FGF19 при различните групи пациенти спрямо здрави контроли, като за някои от групи подбрахме дори по-ниски прагови стойности и установихме още по-висока диагностична точност.

FGF19/ Groups	AUC	Sig.	Cut-off	Sensitivity	Specificity	Positive Likelihood Ratio	Negative Likelihood Ratio	PPV	NPV
IBD Active vs HS	79.1%	0.005	136.7	70%	72.7%	2.57	0.41	87.5%	47.06%
IBD Remis- sion vs HS	77.1%	0.013	114.07	76.2%	72.7%	2.79	0.33	84.2%	61.54%
IBD Surgery vs HS	93.1%	0.001	32.88	90.5%	81.8%	4.98	0.12	90.4%	81.82%
MC vs HS	82.5%	0.006	3.04	71.4%	81.8%	3.93	0.35	83.3%	69.23%

Таблица 7-33. Диагностичната точност на FGF19 спрямо здрави контроли

7.3.2 IBD в активност и FGF19

При тази група пациенти използвахме най-високата „cut-off” концентрация на FGF19 от $\leq 136,7$ pg/mL от всичките останали групи групи и открихме, че чувствителността е 70.9% и специфичността е 72.7% при AUROC 0.79, за откриване на диария свързана с МЖК при IBD групата в активност ($p = 0.005$). При тази стойности FGF19 има PPV от 87.5% и NPV от 47.06% за откриване на МЖК при IBD в активност (Таблица 7-33).

7.3.3 IBD (remission) в ремисия с необяснима хронична диария и стойностите на серумния FGF19

Средният брой на изхождания на пациентите в групата IBD в ремисия е 5.86/дневно, на фона средни стойности на ФКП 81 $\mu\text{g/g}$, като $n=17/21$ (81%) от пациентите съобщават за повече от 3 изхождания дневно и само $n=4/21$ (19%) съобщават за по-малко от 3 изхождания дневно при установена ендоскопска и биохимична ремисия. При тази група пациенти стойности на FGF19 $\leq 114,07$ pg/mL намерихме при 77.1% от пациентите, което кореспондира с това, че МЖК е ко-фактор в патогенезата на диарията при тези 77% от пациентите в ремисия с над 3 изхождания дневно. От проведения ROC анализ и използваната cut-off стойност на FGF19 от $\leq 114,07$ pg/mL, наблюдавахме AUC 0.771 с чувствителност от 76.2% и специфичност от 72.7%, PPV от 84.21% и NPV от 61.54% за откриване на МЖК в тази група пациенти ($p = 0.013$)(Таблица 7-33).

7.3.4 IBD (IR-CD и IPAA) след хирургична интервенция и FGF19

Средният брой на изхождания на пациентите в групата IBD след хирургична интервенция (IR-CD и IPAA) е 9.00/дневно, на фона средни стойности на ФКП 375 $\mu\text{g/g}$. При избрана значително по-ниска горно-

гранична стойност (cut-off) за FGF19 от ≤ 32.88 pg/mL в тази група пациенти, открихме AUROC 0.931 с чувствителност от 90.5%, специфичност от 81.8%, PPV 90.48% и NPV 81.82% за диария дължаща се на МЖК при IBD след хирургични интервенции ($p < 0.001$). При тази група пациенти открихме най-ниските средни стойности на FGF19 и най-високата диагностична точност на серумния FGF19, когато използвахме по-ниски прагови стойности открихме, че 90% от пациентите с IR-CD и IPAA имат МЖК.

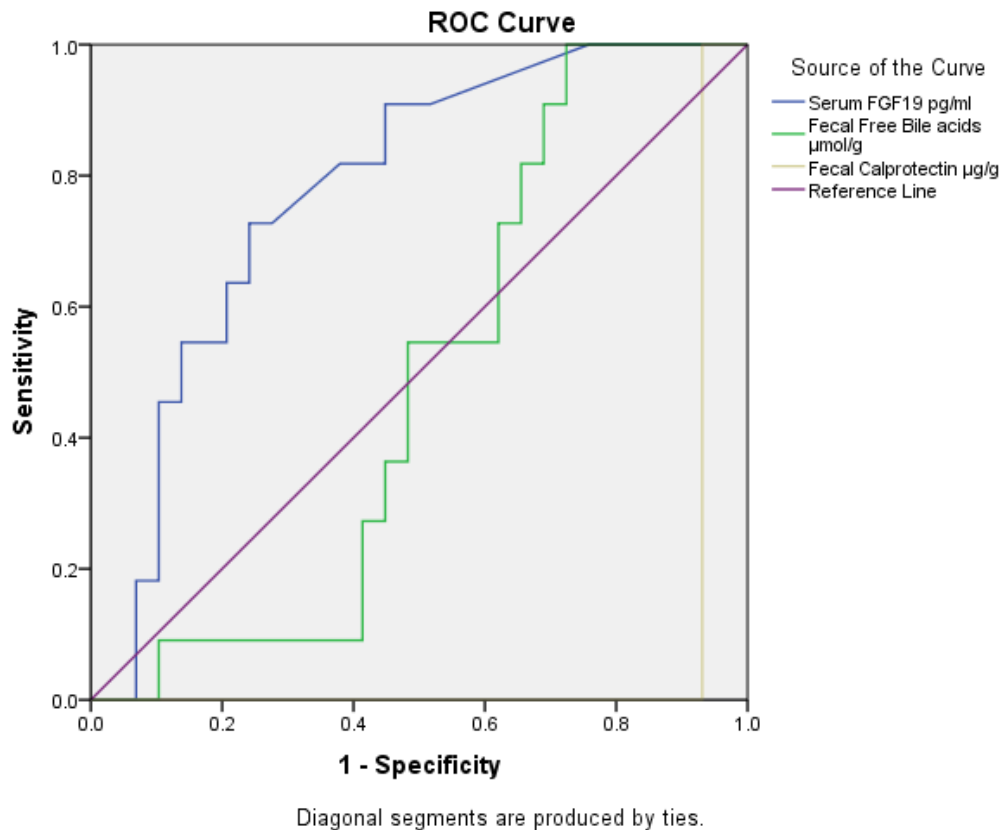
7.3.5 IBS-D и FGF19

При изследваните пациенти с IBS-D с хронична диария не открихме сигнификантна разлика между стойностите на FGF19 при тях и здравите контроли. FGF19 не показва значима разлика при тази група пациенти сравнено със здравите контроли, като средните стойности (median) бяха над 136 pg/mL., което говори, че в тази група пациенти не откриваме МЖК ($p = 0.871$). Няма сигнификантна разлика между стойностите на TFFBA при тази група пациенти и здравите контроли ($p = 0.315$).

7.3.6 Микроскопски колит (МК) и FGF19

Анализът при тази група пациенти показва, че средната стойност (mean) на броя на изхожданията дневно е 9.29/дн. при МК при средна стойност на ФКП от 221.28 $\mu\text{g/g}$. При изследвания FGF19 установихме сигнификантна разлика със здравите контроли. При използвана cut-off за FGF19 от ≤ 30.04 pg/mL намерихме AUROC 0.825 с чувствителност от 71.4%, специфичност от 81.8%, PPV от 83.33% и NPV от 69.23% за диария дължаща се на МЖК при МК ($p = 0.006$). При обработените данни установихме, че $n=10/14$ (71%) пациенти имат данни за МЖК според установените cut-off, което потвърждава ролята на МЖК в патогенезата на МК.

На (Фигура 21) е представен ROC анализът на FGF19 при за пациентите с хронична диария. Сравнен спрямо TFFBA и ФКП. FGF19 се представя значително по-добре от TFFBA при откриване на пациенти с МЖК и хронична диария ($p < 0.001$).



Фигура 21 ROC крива с анализ на FGF19 (pg/ml), фекалните жлъчни киселини (μmol/g) и Фекалния калпротектин (μg/g) за откриване на МЖК

7.4 Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX)

За да определим диагностичната стойност на EDN/EPX, като биомаркер на чревно възпаление и ролята му за определяне на „биохимична“ активност или ремисия при ХВЗЧ и МК, използвахме група от 109 последователни пациенти с БК (n=38), с УК (n=34), с МК (n=14), с IBS-D (n=23) и n=11 здрави контроли. От тези пациенти с БК (n=17) бяха в клинична и ендоскопска ремисия, (n=21) в активност (релапс) с БК изчислени според CDAI. От всичките пациенти с БК (n=38), с резекция на терминалния илеум (IR-CD) в клинична и ендоскопска ремисия бяха n=8 (21.5%), а в клинична и ендоскопска активност с резекция (IR-CD) бяха n=9 (23.5%). Без резекция и в ремисия NR-CD (Remission) бяха n=9 (23.5%) и NR-CD в активност бяха n=12 (31.5%). С УК в ендоскопска ремисия бяха n=12 (35.2%), като останалите n=22 (65.8%) бяха в ендоскопска активност. От тези n=22, n=4 пациента бяха след ПРАА в активност според ендоскопските протоколи и стойностите на ФКП.

Участниците в проучването бяха разделени на 6 групи: **група 1** (IBD Active) n=30, **група 2** (IBD in remission) n=21, **група 3** (IBD after surgery) n=21, **група 4** класифицирани според ROME IV критериите като (IBS-D) n=23, **група 5** (МК) n=14 и **група 6** (Здрави доброволци) n=11. Данните от дескриптивната статистика на стойностите на EDN/EPX при контролната група и всичките групи на пациенти са представени на (**Таблица 7-34**) Показани са дескриптивните резултати като средни стойности на EDN/EPX, FCP и CRP при различните групи пациенти. При проведен анализ по диагнози БК и УК, стойностите на EDN/EPX са с подобна зависимост с тези на ФКП при различните групи БК и УК (ремисия или активност), като няма сигнификантна разлика между групите ($p = 0.266$, $p = 0.525$)(**Таблица 7-37**).

Диагноза	Брой пациенти	EDN/EPX (ng/ml)				Fecal Calprotectin (µg/g)				CRP (mg/dl)	
		Средно равнище	Ст. откл.	Мин	Макс	Средно равнище	Ст. откл.	Мин	Макс	Средно равнище	Ст. откл.
1.IBD active	30	2777.01	2180.56	21.18	6876.78	750.93	465.99	78.00	1800.00	1.26	2.47
2.IBD remission	21	412.15	734.73	6.40	3416.00	81.33	39.70	10.00	182.00	0.32	0.23
3.IBD after surgery	21	1425.09	1479.26	76.00	4688.00	375.00	264.53	25.00	813.00	0.44	0.35
4.IBS-D	23	524.50	684.24	8.00	3157.60	47.51	38.13	5.00	122.00	0.19	0.16
5.MC	14	187.66	186.27	8.00	696.80	221.29	279.93	44.00	1000.00	0.55	0.35
6.HS	11	179.45	118.50	44.00	380.00	43.09	23.20	18.00	82.00	0.31	0.28
Общо	120	1154.65	1660.47	6.40	6876.78	306.47	391.95	5	1800	0.58	1.31

Таблица 7-34. Описателни характеристики на EDN/EPX, FCP и CRP при отделните групи пациенти

При сравнителен анализ се установи, че средните стойности на EDN/EPX на пациентите с IBD Active (група 1) са значимо по-високи, в сравнение със съответните при здравите контроли ($p < 0.001$). Статистически значима разлика е налице и между средните стойности на EDN/EPX на (група 1), спрямо средните стойности при пациентите IBS-D ($p < 0.001$), IBD в ремисия ($p < 0.001$) и здрави контроли ($p < 0.001$). Освен това, стойностите на EDN/EPX на пациентите в групата IBD after surgery се различават значимо от съответните стойности на здравите контроли ($p < 0.001$) (виж. **Таблица 7-34**).

7.4.1 EDN/EPX при пациенти с ХВЗЧ в активност (IBD Active)

Концентрацията на ФКП, фекалния EDN/EPX и серумния CRP при пациенти с активно ХВЗЧ (n=30) бяха сигнификантно завишени спрямо ХВЗЧ в ендоскопска и клинична ремисия ($p < 0.001$). Средните стойности на ФКП при IBD active групата бяха 750 $\mu\text{g/g}$, което е сигнификантно повишено спрямо останалите групи пациенти ($p < 0.001$). Средните стойности на EDN/EPX в същата група пациенти бяха 2777.01 ng/ml, което е значително повишено и статистичко значимо спрямо IBS-D групата и здравите контроли ($p < 0.001$). Средните стойности на CRP при active IBD пациентите бяха 1.26 mg/dl, което също показва съществена статистическа разлика спрямо останалите групи ($p = 0.036$).

	AUC	Sig.	Value of the marker (Cut-off)	Sensitivity	Specificity	Positive Likelihood Ratio	Negative Likelihood Ratio	PPV	NPV
EDN/EPX (IBD Active vs Healthy controls, 366 ng/ml)	85.5%	0.001	366	80%	90.9%	8.8	0.22	96%	62.5%
Fecal Calprotectin IBD Active vs HS (50 $\mu\text{g/g}$)	83.3%	0.001	52	78%	72.7%	2.86	0.3	96.59%	25%

Таблица 7-35. Чувствителност и специфичност на фекалния eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX) и Фекален калпротектин (FC, ФКП)

**Използвахме прагови (cut-off) стойности от 50 $\mu\text{g/g}$ за определяне на чревното възпаление при пациенти с IBD в активност*

С цел да определим диагностичната точност на EDN/EPX ние определихме прагова стойност (cut-off) от 366 ng/mL. и AUC крива 0.855, като над този cut-off приемаме чревно възпаление при пациенти с active

IBD (релапс на заболяването) спрямо контролната група и установихме чувствителност от 80% (95% CI 61.43% до 92.29%), специфичност от 90.9 % (95% CI 58.72% до 99.77%), NPV 62.5% (95% CI 44.3% до 77.74%) и PPV от 96% (78.6% до 99.37%) сравнено с ФКП (50 µg/g cut-off) с чувствителност 78% и специфичност от 72.7% при същата контрола (Таблица 7-35). За референтни граници на този маркер приехме 366 ng/ml, като при стойности над тази приемаме чревно възпаление. Когато използвахме „cut-off“ стойност от (100 µg/g) за ФКП и EDN/EPX (366 ng/ml), се получава чувствителност и специфичност на ФКП от [96.67% (95% CI 82.78% до 99.92%)] и [62.22 % (95% CI 51.38% до 72.23%)], при пациенти с хронична диария (всички групи) срещу здрави контроли. EDN/EPX показва също висока диагностична точност при пациенти с чревно възпаление при чувствителност и специфичност от [80.00% (95% CI 61.43% до 92.29%)] и [61.11 % (95% CI 50.26% до 71.21%)] при всички пациенти с хронична диария срещу контролната група (Таблица 7-36).

	<i>Sensitivity</i>	<i>Specificity</i>	<i>Positive likelihood ratio</i>	<i>Negative likelihood ratio</i>	<i>Positive predictive value</i>	<i>Negative predictive value</i>
FC (100 µg/g)	96.67%	62.22 %	2.56	0.05	46.03%	98.25 %
95% CI	82.78% to 99.92%	51.38% to 72.23%	1.95 to 3.36	0.01 to 0.37	39.36% to 52.85%	89.01% to 99.74%
EDN/EPX (366 ng/ml)	80.00%	61.11 %	2.06	0.33	40.68%	90.16 %
95% CI	61.43% to 92.29%	50.26% to 71.21%	1.50 to 2.82	0.16 to 0.68	33.36% to 48.44%	81.47% to 95.03%
CRP	21.43%	88.46%	1.86	0.89	50.00%	67.65%
95% CI	4.66 % to 50.8 %	88.46% to 97.55%	0.43 to 8.02	0.65 to 1.21	18.81% to 81.19%	60.61% to 73.97%

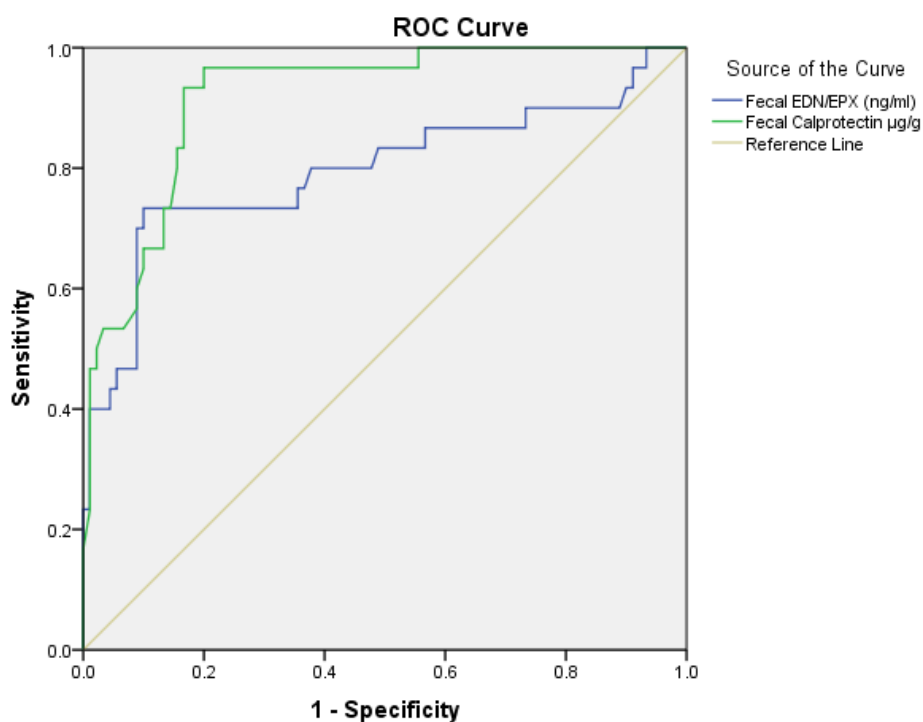
Таблица 7-36. Чувствителност и специфичност на ФКП при (cut-off) 100 µg/g, EDN/EPX и CRP за чревно възпаление при пациенти с хронична диария

За да определим диагностичната точност на ФКП (100 $\mu\text{g/g}$) и EDN/EPX (366 ng/ml) за разграничаване на IBD в активност от групата в ремисия. ROC криви бяха генерирани използвайки CDAI и Mayo score за определяне на активността на заболяването (виж. **Фигура 22**).

Установихме, че избраната прагова стойност (cut-off) на EDN/EPX от 366 ng/ml разграничава пациентите с ХВЗЧ (IBD) в активност с 80.00% чувствителност, 61.11 % специфичност и AUC 0.796 (**Фигура 22**).

	Активна болест		<i>p</i>	Ремисия		<i>p</i>
	БК, <i>n</i> =21	УК, <i>n</i> =22		БК, <i>n</i> =17	УК, <i>n</i> =12	
EDN/EPX	2299 \pm 1846 (21.0-6400.0)	2847.58 \pm 2146	0.266	253.41 \pm 278 (6.4 - 615)	554,63 \pm 300 (10-855)	0.525
ФКП	590.66 \pm 396.17 (78-1800)	767.04 \pm 432.89 (180-1800)		120 \pm 68,1 (25-338)	66.00 \pm 43.8 (10-182)	

Таблица 7-37. Стойности на EDN/EPX и FCP при диагнозите БК и УК сравнени при пациенти в активност или ремисия



Diagonal segments are produced by ties.

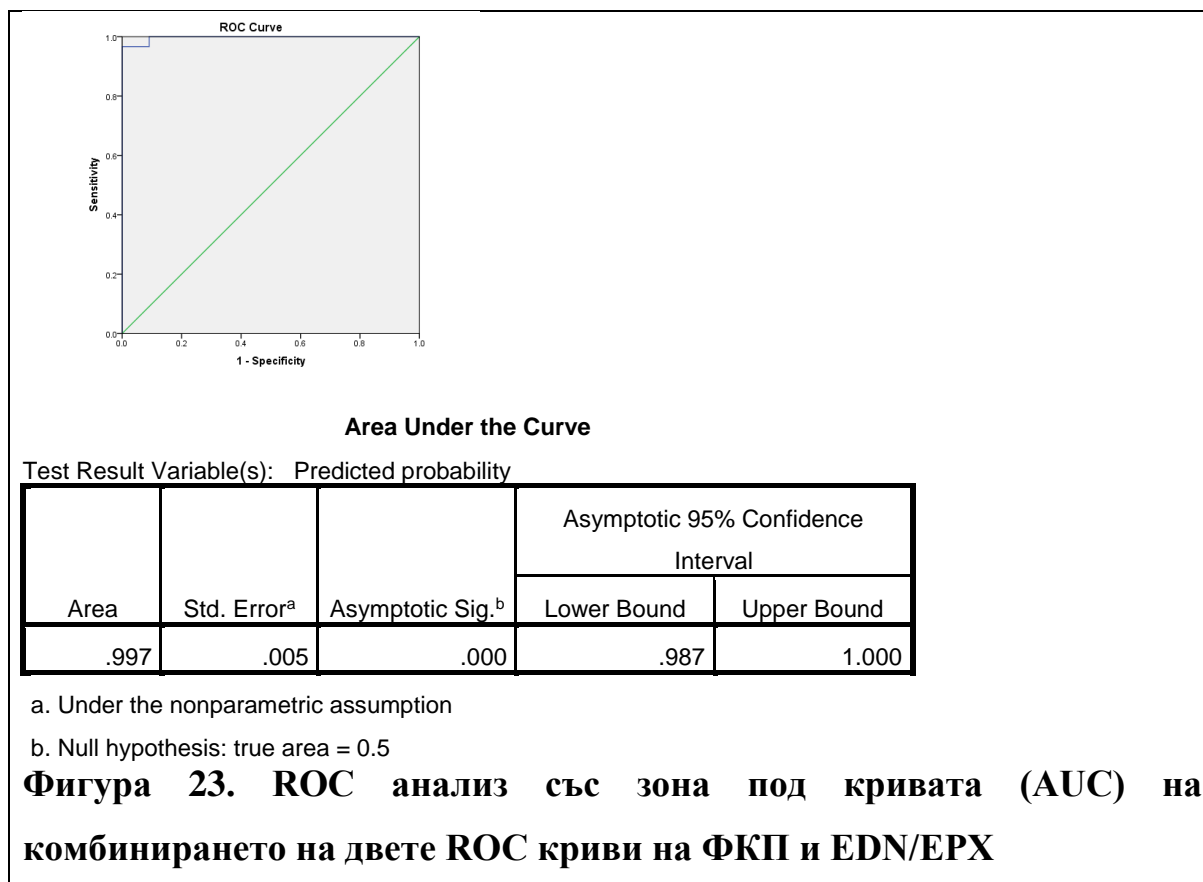
Фигура 22. ROC анализ със зона под кривата (AUC) на EDN/EPX сравнен с ФКП за чревно възпаление при хронична диария

ФКП с прагова стойност (cut-off) 100 $\mu\text{g/g}$ продуцира ROC крива със зона под кривата (AUC) от 0.917, което е сигнификантно значимо ($p <$

0.001). Наличната ROC крива на EDN/EPX е много близка до ФКП, но е по-ниска (AUC 0.796) от тази на ФКП за откриване на чревно възпаление при всички пациенти с хронична диария, но EDN/EPX *показва висока специфичност и статистическа значимост за пациенти с IBD active спрямо ФКП* ($p < 0.001$). ФКП показва голяма диагностична точност за откриване на чревно възпаление сравнено с Mayo score и CDAI ($p < 0.001$).

7.4.2 Комбиниран ROC анализ със зона под кривата (AUC) при комбиниране на ФКП и EDN/EPX

При ROC анализ на комбинираното използване на тези два фекални биомаркера се установи зона под кривата (AUC) от 0.997 (чувствителност 80.00%, специфичност 99.1%), което разграничава сигнификантно почти всички пациенти с органични причини на хроничната диария ($p < 0.001$). (Фигура 23).



При комбинирането на двата фекални маркера негативната предсказваща стойност е 64% (NPV), докато позитивната предсказваща

стойност е 99.10% (PPV) с цялостна крайна диагностична точност (accuracy) за откриване на пациенти с чревно възпаление с 85.73% (виж. **Фигура 24**).

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	80.00%	61.43% to 92.29%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	99.10%	71.51% to 100.00%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\text{Sensitivity}}{1 - \text{Specificity}}$		
Negative Likelihood Ratio	$\frac{1 - \text{Sensitivity}}{\text{Specificity}}$	0.20	0.10 to 0.41
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	73.17% (*)	57.06% to 85.78%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	100.00% (*)	
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	64.71 % (*)	47.26% to 78.95%
Accuracy	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	85.37% (*)	70.83% to 94.43%

Фигура 24. NPV и PPV и цялостна диагностична точност на EDN и ФКП за откриване на интестинално възпаление при пациенти с хронична диария

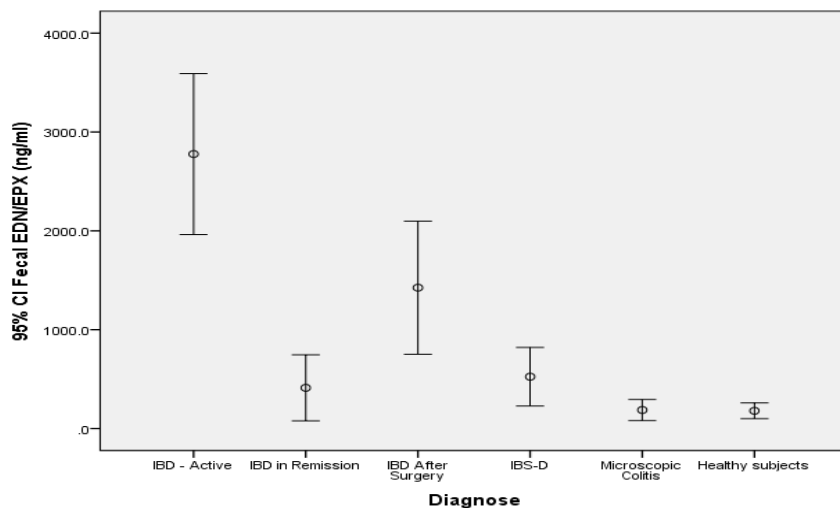
7.4.3 Разпределение на END/EPX по групи пациенти

Стойностите на EDN/EPX са представени при различните групи пациенти на (**Фигура 25**) и (**Фигура 26**), като е използван Kruskal–Wallis ANOVA тест за определяне на хоризонталните точки при всички пациенти.

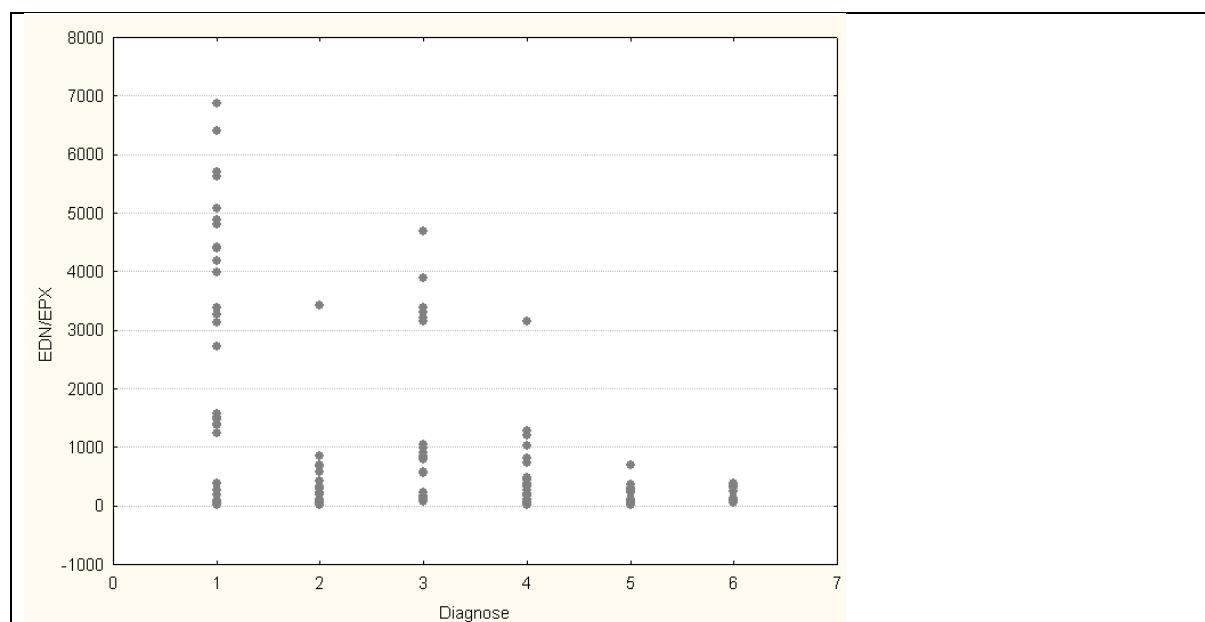
Най-високи средни стойности установихме при IBD-Active и IBD след хирургична интервенция, което корелира със стойностите на ФКП и има същото разпределение както при ФКП в различните групи ($p = 0.420$).

7.4.4 EDN/EPX и МК

Средните стойности на EDN/EPX при пациентите с МК (n=14) са 187.66 ng/ml, като не показват статистическа разлика между стойностите с IBS-D и здравите контроли ($p = 0.900$).



Фигура 25. Разпределение на стойностите на END/EPX по групи



Фигура 26. Нива на END/EPX при различните групи пациенти 1- IBD Active, 2 – IBD Remission, 3 – IBD after surgery, 4 – IBS-D, 5 – MC и 6 - здрави контроли*

*Хоризонталните точки изобразяват горната граница на нормата (5th and 95th percentile). Kruskal–Wallis ANOVA е използван за изобразяване на стойностите.

7.5 Сравнителен анализ на FGF19, TFFBA, EDN/EPX спрямо ФКП клинични и ендоскопски маркери за тежест на диарията

7.5.1 Анализ на клиничните данни за тежестта на хроничната диария в нашата кохорта

Средната докладвана честота на изхожданията дневно чрез използвания въпросник (**Таблица 6-1**) в групата IBD active (активност, релапс) от пациентите е 7.83/дн (range 3-13), при IBD remission (в ремисия) е 5.86/дн. (range 2-9), IBD след резекция докладват средно по 9.00/дн. изхождания (range 3-15), IBS-D пациентите докладват 4.65/дн, пациентите с МК докладват по 9.29/дн. воднисти изхождания и здравите доброволци (контроли) докладват по 1.36/дн. дефекации. От всички включени в анализа, n=28 (23%) докладват за среден брой изхождания по форма отговарящ на Bristol Stool Scale (BSS) под <6, където 82 (77%) отговарят за среден брой дневно изхождания по BSS форма ≥ 6 ($p < 0.001$). Ние открихме, че 90% от пациентите с функционални заболявания (IBS-D) докладват по-висок процент на BSS форма ≥ 6 , спрямо пациентите с органични заболявания, 21/23 (91%) срещу 62/86 (72%) ($p = 0.011$). По отношение на BSS скалата 21/23 пациента с IBS-D са отбелязали BSS форма ≥ 6 . При пациентите с МК 14/14 са докладвали за над ≥ 3 изхождания дневно, където 4/14 (28%) са докладвали за BSS 6, а 10/14 (72%) са докладвали за BSS 7. Изследваният stool index (SI) при IBD пациенти показва 49 ± 21 , IBD в ремисия 33 ± 13 , IBD след хирургия са 58 ± 23 , IBS-D са 31 ± 18 , МК пациентите докладва за 63 ± 25 и здравите контроли за 6 ± 3 ($p < 0.001$) (**Таблица 7-38**). IBS-D докладват за по-малък брой изхождания дневно, но с по-течна консистенция BSS тип 7 ($p < 0.001$). Не установихме значима взаимовръзка, между пола на различните групи и тежестта на диарията ($p = 0.117$). По отношение на възрастта установихме,

че има единствено статистическа разлика в групата на МК, която е 60г. ± 17г. и е различна спрямо останалите групи изследвани пациенти ($p = 0.021$).

	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
Брой пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	$p = 0.435$
Пол, Жени (%)	13 (43)	9 (43)	9 (43)	13 (57)	11 (78)	5 (45)	$p = 0.265$
Възраст, mean ± SD	45a ± 13	50a,b ± 15	48a,b ± 17	46a,b ± 15	60b ± 17	41a ± 17	$p = 0.117$
Stool Index (SI), mean ± SD	49a,b ± 21	33a,c ± 13	58b ± 23	31c ± 18	63b,d ± 25	6e ± 3	$p < 0.001$
Stool frequency/day, mean ± SD	8a,b ± 3	6a,c ± 2	9b ± 3	5c ± 2	9b,d ± 3	1e ± 1	$p < 0.001$

Таблица 7-38. Сравнение между stool index и честотата на изхожданията при различните групи пациенти

7.5.2 EDN/EPX спрямо ФКП и CRP (като маркери на възпаление)

На (Таблица 7-39) установихме корелация между средните стойности

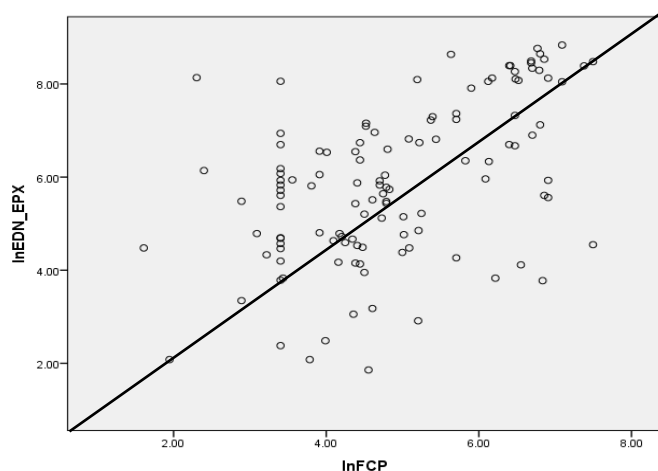
	Fecal Calprotectin			Fecal EDN/EPX		
	Mean	10 th and 90 th percentile		Mean	10 th and 90 th percentile	
IBD Active	750.93	192.50	1560.00	2777.027	50.840	5693.400
IBD in Remission	81.33	23.40	142.00	412.152	19.520	816.480
IBD After surgery	375.00	71.40	775.60	1425.086	100.320	3793.440
IBS-D	47.51	8.60	117.20	524.504	24.880	1251.520
Микроскопски колит	221.29	49.00	850.00	187.657	10.000	534.400
Здрави Контроли	43.09	18.80	82.00	179.455	52.560	375.200

Таблица 7-39. Средни стойности на ФКП и EDN/EPX

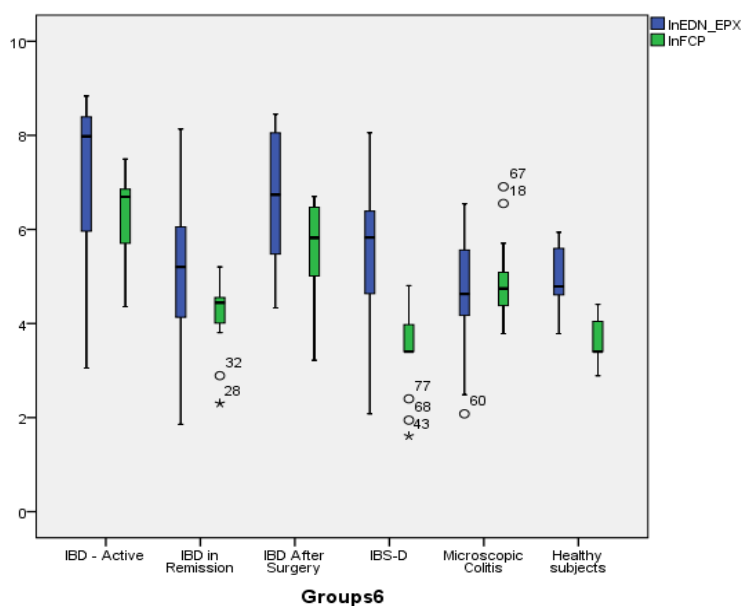
и 10-ти и 90-ти персентил на ФКП и EDN/EPX, като между двата маркера.

7.5.3 Линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП

На (Фигура 27) изобразихме данните от получения регресионен анализ между логаритмуваните стойности на изследваните биомаркерите, като установихме зависимост, но не е силно изразена ($r = 0.36$ и $r = 0.50$). Поради нуждите на статистическата обработка използвахме логаритмувани стойности на EDN/EPX поради неправното разпределение на данните.



Фигура 27. Логаритмуваните стойности на маркерите при линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП.



Фигура 28. Box-plot анализ на логаритмичните стойностите на EDN/EPX и ФКП при различните групи пациенти

На (

Фигура 28) установихме подобно разпределение на логаритмувани стойностите на END/EPX и ФКП в различните групи пациенти, като стойностите на изследваните биомаркери се различават значимо при изследваните пациентите от различните групи спрямо здрави контроли ($p < 0.001$).

Групово разпределение на фекалните маркери					
	Groups6	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Фекален калпротектин µg/g	IBD - Active	30	750.93	465.994	85.078
	IBD in Remission	21	81.33	39.701	8.663
Фекален EDN/EPX (ng/ml)	IBD - Active	30	2777.027	2180.5522	398.1125
	IBD in Remission	21	412.152	734.7308	160.3314

Таблица 7-40. Сравнение на средни стойности и стандартното отклонение на ФКП и EDN/EPX при IBD active и IBD в ремисия.

При сравнението на двете групи за IBD active и пациентите в IBD ремисия установихме статистически значими разлики между двете групи в стойностите на маркерите на чревно възпаление ФКП и EDN/EPX ($p < 0.001$) (виж **Таблица 7-40**) и (**Таблица 7-41**).

		Levene's Test за равенство		t-test за равенство м/у Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
FC	Equal variances assumed	33.328	.000	6.548	49	.000
	Equal variances not assumed			7.830	29.600	.000
EDN/EPX	Equal variances assumed	41.890	.000	4.772	49	.000
	Equal variances not assumed			5.510	37.731	.000

Таблица 7-41. Levene's Test for Equality of Variances за стойностите на ФКП и EDN/EPX.

Установява се значима разлика и при сравняване на стойностите на маркерите на чревно възпаление при IBD active със здрави контроли и малките вариации в стандартното отклонение при здравите контроли ($p < 0.001$) (**Таблица 7-42**) и (**Таблица 7-43**).

Групово разпределение на фекалните маркери					
	Groups ⁶	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Fecal Calprotectin µg/g	IBD - Active	30	750.93	465.994	85.078
	Healthy subjects	11	43.09	23.197	6.994
Fecal EDN/EPX (ng/ml)	IBD - Active	30	2777.027	2180.5522	398.1125
	Healthy subjects	11	179.455	118.5012	35.7295

Таблица 7-42. ФКП и EDN/EPX при IBD active и здрави контроли

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
FC	Equal variances assumed	18.316	.000	4.995	39	.000
	Equal variances not assumed			8.292	29.389	.000
EDN/EPX	Equal variances assumed	39.715	.000	3.917	39	.000
	Equal variances not assumed			6.499	29.464	.000

Таблица 7-43. Levene's Test for Equality of Variances за IBD active и здрави контроли

7.5.4 Индекси за оценка на болестна активност и оценка тежестта на диарията (CDAI, Mayo score и SI) - корелация със стойностите на EDN/EPX

Наблюдавахме силна корелация между стойностите на EDN/EPX и стойностите на CDAI при всички пациенти с БК (активност и ремисия) (корелационен коефициент на Pearson Correlation $r=0.680$, $p < 0.001$). Установихме силна позитивна корелация със стойностите на ендоскопския Мейо скор (EMS) при всички пациенти с УК (активност и ремисия) ($r=0.700$, $p < 0.001$), а също и с клиничния индекс Mayo Score (Full) за оценка на болестна активност при УК ($r=0.855$, $p < 0.001$) (Таблица 7-44). В група 1 с активност (IBD active) ние намерихме много силна корелация между EDN/EPX със скоровите системи Mayo score, CDAI и ендоскопския скор EMS ($r=0.913$, $p < 0.001$; $r=0.854$, $p < 0.001$; $r=0.810$, $p < 0.001$) (Таблица 7-44) (Таблица 7-48).

Слаба позитивна корелация намерихме при съпоставяне стойностите на EDN/EPX и SI индекса ($r=0.200$, $p = 0.029$) и открихме слаба корелация между EDN/EPX и броя на изхожданията/дневно при пациентите с хронична диария ($r = 0.229$, $p = 0.012$) (Таблица 7-45)

Диагноза	EDN/EPX Корелация	Mayo Score (full)	CDAI	Endoscopic Mayo score (EMS)
Всички IBD пациенти N=72	Pearson Correlation	.855**	.680**	.700**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000
	N	34	38	34
1. IBD Active	Pearson Correlation	.913	.854*	.810*
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000
	N	18	12	18

Таблица 7-44. Корелация между EDN/EPX и индекси за оценка на болестна активност (CDAI и Mayo) с ендоскопския скор (EMS)

Корелационен анализ				
		Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Stool Index (SI)	Stool frequency/day
Фекален EDN/EPX (ng/ml)	Pearson Correlation	1	.200*	.229*
	Sig. (2-tailed)		.029	.012
	N	120	120	120
Stool Index (SI)	Pearson Correlation	.200*	1	.963**
	Sig. (2-tailed)	.029		.000
	N	120	120	120
Честота на изхожданията/дневно	Pearson Correlation	.229*	.963**	1
	Sig. (2-tailed)	.012	.000	
	N	120	120	120

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Таблица 7-45. Корелация между EDN/EPX със Stool Index и Stool frequency/day

На (Таблица 7-46) е отразена статистическата зависимост между EDN/EPX и ендоскопския скор EMS, BSS, периферните серумни еозинофили и тютюнопушенето сред изследваните пациенти. Проверката е

направена чрез ANOVA test, и се наблюдава сигнификантна зависимост в стойностите на EDN/EPX и оцененият ендоскопския Mayo Score (EMS) за активност на УК. Стойностите EDN/EPX корелират с тежестта на ендоскопската активност при УК, оценена чрез EMS ($p < 0.001$). При сравнение на EDN/EPX с броя на периферните еозинофили в серума и с формата на изпражненията (според BSS скалата) не се открива взаимовръзка ($p = 0.824$, $p = 0.718$). Открива се гранична корелационна зависимост между стойностите на EDN/EPX и активните пушачи ($p = 0.050$, Levene's test).

EDN/EPX	Levene's test	ANOVA p-value	Welch test	Brown-Forsythe test	Брой случаи
Eo count (percent)	0.138	0.824	-	-	120
EMS	0.001	0.000	0.000	0.000	34
Bristol stool scale (BSS)	0.197	0.718	-	-	120
Пушачи	0.050	0.233	0.000	0.085	120

Таблица 7-46. Анализ за наличие на зависимост между EDN/EPX и EMS, BSS, Eo count и тютюнопушенето

В нашето проучване се наблюдават средни стойности на CDAI в IBD активната група от 338 ± 74 , които са статистически различни от тези на IBD в ремисия 107 ± 47 ($p = 0.043$). Не открихме значима разлика в активността на заболяването оценена с CDAI между IBD активност и IBD след хирургия ($p = 0.058$). При Mayo score (full) за УК пациенти открихме сигнификантна разлика между IBD active 7.94 ± 2.623 и IBD в ремисия 1.33 ± 0.778 ($p = 0.004$), но не намерихме разлика между стойностите на Mayo score при IBD active и IBD хирургична интервенция ($p = 0.903$). Сравнявайки ендоскопския Mayo score (EMS) видяхме същите зависимости при групите с УК ($p < 0.001$) (Таблица 7-47).

	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
Брой пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	$p = 0.435$
Пол, женски (%)	13 (43)	9 (43)	9 (43)	13 (57)	11 (78)	5 (45)	$p = 0.265$
Възраст, mean \pm SD	45a \pm 13	50a,b \pm 15	48a,b \pm 17	46a,b \pm 15	60b \pm 17	41a \pm 17	$p = 0.117$
CDAI, mean \pm SD	338a \pm 74	107b \pm 47	257a \pm 126	-	-	-	$p = 0.043$
Mayo score (full), mean \pm SD	7.94a \pm 2.623	1.33b \pm 0.778	7.75a \pm 2.754	-	-	-	$p = 0.004$
Endoscopic Mayo Score, mean \pm SD	2.28a \pm 0.575	0.42b \pm 0.515	2.00a \pm 0.816	-	-	-	$p < 0.001$
Stool Index (SI), mean \pm SD	49a,b \pm 21	33a,c \pm 13	58b \pm 23	31c \pm 18	63b,d \pm 25	6e \pm 3	$p < 0.001$

Таблица 7-47. Анализ на индексите за оценка на болестна активност при IBD

7.5.5 Корелация между EDN/EPX и ФКП

От проведения корелационен анализ установихме сигнификантна позитивна корелационна зависимост във всички групи от пациенти между EDN/EPX и стойностите на ФКП ($r=0.601$, $p < 0.001$, Pearson Correlation). Стойностите са показани на **Таблица 7-48**. Когато проучихме групите отделно една от друга, се установи значима корелационна връзка в група 3 (IBD after surgery) между EDN/EPX и ФКП ($r=0.694$, $p < 0.001$). Стойностите на фекалния EDN/EPX корелират по-изразено с ФКП, отколкото с CRP. (**Таблица 7-48**). Не се установи статистическа

сигнификантна корелация между EDN/EPX при MC и IBS-D пациентите ($r=-0.0365$, $p=0.902$ и $r=0.121$, $p=0.583$). Проведохме корелационен анализ на стойностите на фекалния EDN/EPX със серумните стойности на еозинофилите (брой и процент), като беше открита сигнификантна значима връзка при група 3 (IBD after surgery) ($r=0.677$, $p<0.001$, Pearson Correlation) и групата с MC ($r=0.853$, $p<0.001$). Не се установи корелация между EDN/EPX и биомаркерите за МЖК (TFFBA и FGF-19) във всички изследвани групи ($r=-0.104$, $p=0.256$ и $r=-0.121$, $p=0.189$).

Диагнози	EDN/EPX correlations	Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	CRP (mg/dl)	Mayo Score (full)	CDAI	TFFBA ($\mu\text{mol/g}$)	Serum FGF19 (pg/ml)	Eosinophils count in serum (G/l)	Stool Index (SI)	Stool frequency/day
Всички групи	Pearson Correlation	.601*	.311*	.855*	.680*	-.104	-.121	.097	.200*	.229*
	Sig. (2-tailed)	.000	.001	.000	.000	.256	.189	.290	.029	.012
	N	120	120	34	38	120	120	120	120	120
1. IBD Active	Pearson Correlation	.275	.219	.913*	.854*	-.364*	-.081	-.082	-.081	-.044
	Sig. (2-tailed)	.142	.245	.000	.000	.048	.669	.668	.671	.819
	N	30	30	18	12	30	30	30	30	30
2. IBD in remission	Pearson Correlation	-.472*	-.053	.479	.607	-.227	-.038	.334	-.156	-.154
	Sig. (2-tailed)	.031	.819	.115	.083	.323	.870	.139	.500	.505
	N	21	21	12	9	21	21	21	21	21
3. IBD after surgery	Pearson Correlation	.694*	.148	.990*	.499*	-.059	-.174	.677*	.422	.426
	Sig. (2-tailed)	.000	.522	.010	.035	.800	.451	.001	.056	.054
	N	21	21	4	18	21	21	21	21	21
4. IBS-D	Pearson Correlation	.121	-.105	. ^a	. ^a	.114	.072	-.118	-.059	-.064
	Sig. (2-tailed)	.583	.633			.605	.742	.591	.790	.773
	N	23	23	0	0	23	23	23	23	23
5. MC	Pearson Correlation	-.036	.133	. ^a	. ^a	.415	-.163	.853*	.366	.298
	Sig. (2-tailed)	.902	.651			.140	.579	.000	.198	.300
	N	14	14	0	0	14	14	14	14	14
6. Healthy subjects	Pearson Correlation	.080	-.427	. ^a	. ^a	.283	-.280	.294	.258	.298
	Sig. (2-tailed)	.815	.190			.400	.405	.381	.444	.373
	N	11	11	0	0	11	11	11	11	11

Таблица 7-48. Корелация между EDN/EPX и ФКП, CRP, Mayo score, CDAI, и SI и биомаркерите за МЖК. В зелено са обозначени резултатите където има сигнификантна корелация.

На (Таблица 7-49.) са представени резултатите от проверката на хипотези за наличие на статистически значима разлика между средните стойности на EDN/EPX при групите пациенти с хирургични интервенции при IBD, като IPAA, Crohn after surgery (IR-CD), ROME IV критериите и редуцията на килограмите на всички пациенти. Установихме, че стойностите на EDN/EPX имат значима корелация със степента на редуция на килограмите при всички изследвани $n=109$ пациента проучването ($p = 0.02$). При останалите изследвания показатели IPAA, IR-CD и отговорилите на ROME IV критериите за IBS-D не открихме корелация със стойностите на EDN/EPX ($p > 0.05$).

EDN/EPX	t-test, p-value	Брой случаи
IPAA	0.710	4
Crohn Surgery status	0.463	17
ROME IV	0.162	120
Загуба на килограми	0.02	120
Таблица 7-49. Корелация на EDN/EPX с IPAA, Crohn after surgery (IR-CD), ROME IV критериите и редуцията на килограмите.		

Проведохме корелационен анализ на стойностите на EDN/EPX спрямо резултата от ендоскопските протоколи и установихме, че има сигнификантна корелация при пациентите с УК и БК в активност и корелация със стойностите на пациентите с EDN/EPX в ендоскопска ремисия ($p = 0.029$, $p < 0.001$) (Таблица 7-50). Изследвахме зависимостта между стойностите на EDN/EPX и описаните ендоскопски изменения при пациенти с резекция на терминален илеум и IPAA ($p = 0.022$, $p = 0.035$). Не установихме друга корелационна зависимост между EDN/EPX и другите резултати от ендоскопските находки спрямо разделянето в различни групи ($p > 0.05$). Проведохме корелационен анализ между зависимостта на

стойностите на EDN/EPX и хистологичните резултати от патоанатомичните протоколи за всички групи пациенти разделени по диагнози, групи и разпределени по стойности на EDN/EPX. Установихме позитивна корелационна зависимост между хистологично докладваните БК и УК (независимо в ремисия или активност) със стойностите на EDN/EPX от резултатите от хистологичните резултати ($p = 0.015$, $p = 0.019$). При останалите групи пациенти не се установява корелационна зависимост между EDN/EPX и данните от ендоскопските протоколи ($p > 0.05$).

p-value/брой случаи	0	1 Minimal mucosal findings in terminal ileum (follicular reaction)	2 Minimal mucosal findings in large bowel - erosions, inunction,	3 Crohn's after resection in terminal ileum	4 Crohn's L1 – no resection (NR-CD)	5 Crohn's L2 or L3	6 Ulcerative colitis Active	7 Ulcerative colitis in remission	8 Ulcerative Colitis after Surgery (J-Pouch)
0	-	0.272/34	0.410/37	0.022/17	0.028/45	0.135/34	0.000/47	0.298/41	0.035/4
1		-	0.338/13	0.921/17	0.840/21	0.274/10	0.029/23	0.441/19	0.129/4
2			-	0.055/24	0.059/24	0.147/13	0.000/26	0.578/20	0.039/4
3				-	0.862/32	0.275/21	0.005/34	0.253/28	0.039/21
4					-	0.298/21	0.009/34	0.206/28	0.076/21
5						-	0.889/23	0.176/17	0.904/10
6							-	0.000/30	0.748/23
7								-	0.05/17

Таблица 7-50. Корелация между нивата на EDN/EPX спрямо резултатите от ендоскопските протоколи (находки по време на колоноскопия)

Корелационен анализ на пациентите					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin µg/g	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.500**	.240**
		Sig. (2-tailed)	.	.000	.008
		N	120	120	120
	Fecal Calprotectin µg/g	Correlation Coefficient	.500**	1.000	.391**
		Sig. (2-tailed)	.000	.	.000
		N	120	120	120
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	.240**	.391**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.008	.000	.
		N	120	120	120

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Таблица 7-51. Корелация (Spearman's) на фекалния EDN/EPX, FCP и CRP за всички групи пациенти.

Проведохме и статистически тест за определяне на корелация между трите променливи EDN/EPX, FCP и CRP, като използвахме ранговия коефициент на Spearman's за характеризирание на връзките между маркерите. На (Таблица 7-51) са представени резултати при които установихме позитивна значителна корелация между фекален EDN/EPX и ФКП с CRP при всички групи пациенти ($p = 0.008$).

Не откриваме корелация между EDN/EPX, FCP и CRP в групите IBS-D, MC и Здрави доброволци, като ги разглеждаме по-отделно ($p > 0.05$) (Таблица 7-53) При определяне на корелационните връзки между различните диагнози отделно една от друга, установихме слаба корелация между FCP и CRP в групата на IBD active (Таблица 7-52)($r=0.373$, $p = 0.042$).

Корелационен анализ на IBD в активност					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin µg/g	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.242	.385*
		Sig. (2-tailed)	.	.197	.036
		N	30	30	30
	Fecal Calprotectin µg/g	Correlation Coefficient	.242	1.000	.373*
		Sig. (2-tailed)	.197	.	.042
		N	30	30	30
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	.385*	.373*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.036	.042	.
		N	30	30	30

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Таблица 7-52. Корелация на маркерите в група 1 (IBD Active)

При пациентите с IBD в ремисия установихме отрицателна корелация между EDN/EPX и ФКП ($r=-0.449$, $p = 0.041$) (виж **Таблица 7-53**).

IBD в ремисия и необяснима диария					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin µg/g	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	-.449*	.044
		Sig. (2-tailed)	.	.041	.849
		N	21	21	21
	Fecal Calprotectin µg/g	Correlation Coefficient	-.449*	1.000	.130
		Sig. (2-tailed)	.041	.	.576
		N	21	21	21
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	.044	.130	1.000
		Sig. (2-tailed)	.849	.576	.
		N	21	21	21

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Таблица 7-53. Отрицателна корелация при IBD в ремисия между EDN/EPX и FCP

Открихме силно позитивна корелация между EDN/EPX и ФКП при IBD пациенти след резекция ($r=0.729$, $p < 0.001$)(Таблица 7-54).

Корелационен анализ на IBD след хирургична интервенция					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.729**	.284
		Sig. (2-tailed)	.	.000	.212
		N	21	21	21
	Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	Correlation Coefficient	.729**	1.000	.246
		Sig. (2-tailed)	.000	.	.283
		N	21	21	21
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	.284	.246	1.000
		Sig. (2-tailed)	.212	.283	.
		N	21	21	21

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Таблица 7-54. Корелация между EDN/EPX и ФКП при IBD след хирургични интервенции (илеална резекция или J-rouch anastomosis)

Таблица 7-55. Корелация на EDN/EPX и ФКП при IBS-D					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.272	-.002
		Sig. (2-tailed)	.	.210	.993
		N	23	23	23
	Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	Correlation Coefficient	.272	1.000	.002
		Sig. (2-tailed)	.210	.	.994
		N	23	23	23
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	-.002	.002	1.000
		Sig. (2-tailed)	.993	.994	.
		N	23	23	23

Здрави контроли - корелация					
			Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Fecal Calprotectin µg/g	CRP (mg/dl)
Spearman's rho	Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.131	-.442
		Sig. (2-tailed)	.	.701	.174
		N	11	11	11
	Fecal Calprotectin µg/g	Correlation Coefficient	.131	1.000	.033
		Sig. (2-tailed)	.701	.	.924
		N	11	11	11
	CRP (mg/dl)	Correlation Coefficient	-.442	.033	1.000
		Sig. (2-tailed)	.174	.924	.
		N	11	11	11

Таблица 7-56. Корелация между EDN/EPX и ФКП при Здрави контроли.

За да проверим дали има статистическа зависимост между стойностите на EDN/EPX и FCP в групите IBD Active, IBD in remission и здрави контроли проведохме (t-test for Equality of Means и определихме p-value), като на **Таблица 7-58** се виждат средните стойности на ФКП и EDN/EPX, от което става ясно, че има изразена сигнификантна значимост между двата маркера.

Групова статистика на двата маркера					
	Groups6	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Fecal Calprotectin µg/g	IBD - Active	30	750.93	465.994	85.078
	IBD in Remission	21	81.33	39.701	8.663
Fecal EDN/EPX (ng/ml)	IBD - Active	30	2777.027	2180.5522	398.1125
	IBD in Remission	21	412.152	734.7308	160.3314

Таблица 7-57. Средни стойности на ФКП и EDN/EPX при IBD Active и IBD in remission.

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
FC	Equal variances assumed	33.328	.000	6.548	49	.000
	Equal variances not assumed			7.830	29.600	.000
EDN/EPX	Equal variances assumed	41.890	.000	4.772	49	.000
	Equal variances not assumed			5.510	37.731	.000

Таблица 7-58. Сигнификантна зависимост между EDN/EPX и FCP при пациенти с IBD Active и IBD in remission (Levene's Test for Equality of Variances).

7.5.6 Сравнение на EDN/EPX с периферния брой на Еозинофили в кръвта

При сравнение на стойностите на фекалния EDN/EPX с периферния брой на еозинофили в кръвта не установихме статистическа значима взаимовръзка при различните групи пациенти и здрави контроли ($p = 0.626$) (Таблица 7-59).

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	2663,929 ^a	2688	,626
Likelihood Ratio	475,654	2688	1,000
Linear-by-Linear Association	1,128	1	,288
N of Valid Cases	120		

a. 2825 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,01.

Таблица 7-59. Pearson Chi-Square за EDN/EPX и периферни Еозинофили в кръвта

За целите на корелационния и линеен регресионен анализ EDN/EPX индексите бяха трансформирани в естествен логаритъм при част от анализите.

7.5.7 Микроскопски колит срещу IBS-D (ROME IV критерии), нощна диария, демографски показатели (възраст, пол)

При изследваните взаимовръзки в нашата популация установихме, че отговорилите на въпросника (виж. **Таблица 6-1**) са отговори на ROME IV критериите за IBS-D при $n=9$ (30%) от IBD active, $n=2$ (9.5%) от IBD в ремисия, $n=6$ (28.6%) от IBD след хирургия, $n=23$ (100%) от пациентите с IBS-D, $n=10$ (71.4) от МК и $n=0$ от здравите доброволци (контроли) ($p < 0.001$). Процентно най-много пациенти са покрили ROME IV при МК и IBS-D, което говори за най-голям „overlap” между тези две състояния. Статистически сигнификантна разлика установихме при докладваните брой дефекации през нощта, като $n=23$ (76%) от IBD в ремисия, $n=4$ (19%), от IBD след хирургия $n=10$ (47%), от IBS-D само $n=2$ (8.7%) докладват за нощни дефекации, докато при МК $n=9$ (64%) и при здравите контроли $n=0$ докладват за нощни дефекации ($p < 0.001$). Статистически еднаква се оказва продължителността на диарията при всички пациенти и не открихме разлика в докладваните резултати ($p = 0.512$). Не установяваме статистически значима разлика между МК и IBS-D при отговора на въпроса „имате ли диария по време на гладуване” ($p = 0.531$)

При сравнение между различните категории установихме статистическа значимост със средната възраст на пациентите с МК $60\text{г.} \pm 17\text{г.}$ спрямо останалите групи изследвани пациенти ($p = 0.021$). При всички включени пациенти в това проучване (60 мъже и 60 жени) установихме равномерно разпределени в различни групи по диагнози, само в групата с МК установихме превалиране на женския пол $n=11$ (78%) жени спрямо $n=3$ мъже, което е статистически значимо ($p = 0.044$) (**Таблица 7-60**).

	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
Брой пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	<i>p</i> = 0.435
Пол, Жени (%)	13 (43)	9 (43)	9 (43)	13 (57)	11 (78)	5 (45)	<i>p</i> = 0.265
Възраст, mean ± SD	45a ± 13	50a,b ± 15	48a,b ± 17	46a,b ± 15	60b ± 17	41a ± 17	<i>p</i> = 0.117
Stool Index (SI), mean ± SD	49a,b ± 21	33a,c ± 13	58b ± 23	31c ± 18	63b,d ± 25	6e ± 3	<i>p</i> < 0.001
Stool frequency/day, mean ± SD	8a,b ± 3	6a,c ± 2	9b ± 3	5c ± 2	9b,d ± 3	1e ± 1	<i>p</i> < 0.001
Продължителност на диарията (седмици), median (25-75th percentile)	5 (4-6)	4 (4-5)	6 (4-7)	5 (5-6)	6 (6-15)	0(0)	<i>p</i> < 0.001
Нощни дефекации, n (%)	23a (76)	4a,b (19)	10a (47)	2b (8.7)	9a (64)	0 (0)	<i>p</i> < 0.001
Диария при гладуване, n (%)	12a (40)	5a (23)	11a (52)	5a (21)	6a (42.9)	0(0)	<i>p</i> = 0.029
ROME IV, n (%)	9a,c (30%)	2a (9.5)	6a,c (28.6)	23b (100)	10b ,c (71.4)	0(0)	<i>p</i> < 0.001

Таблица 7-60. Сравнителна характеристика на маркерите за тежест на диарията спрямо отделните групи

7.5.8 FGF-19 спрямо Stool Index и честотата на изхожданията при Микроскопски колит (МК)

Средната честота на изхожданията дневно на пациенти с МК е 9.29/дн. и SI 63 ± 25 , при което стойностите на FGF-19 са под $\leq 30,04$ pg/mL. при $n=10/14$ (71%) от пациентите с МК. При същата група наблюдавахме значителна статистическа асоциация и отрицателна корелация между размера на субепителния колагенов слой и стойностите на FGF-19 в контекста на тежка хронична диария ($r=-0.489$, $p = 0.002$). От обработените резултати, се установява, че след статистическа корекция за маркерите на чревно възпаление (изваждане на ФКП и CRP), FGF-19 е с добра предсказваща стойност за степента на диария при МК и дори корелира с дебелината на колагеновия слой ($p = 0.002$) (Таблица 7-61).

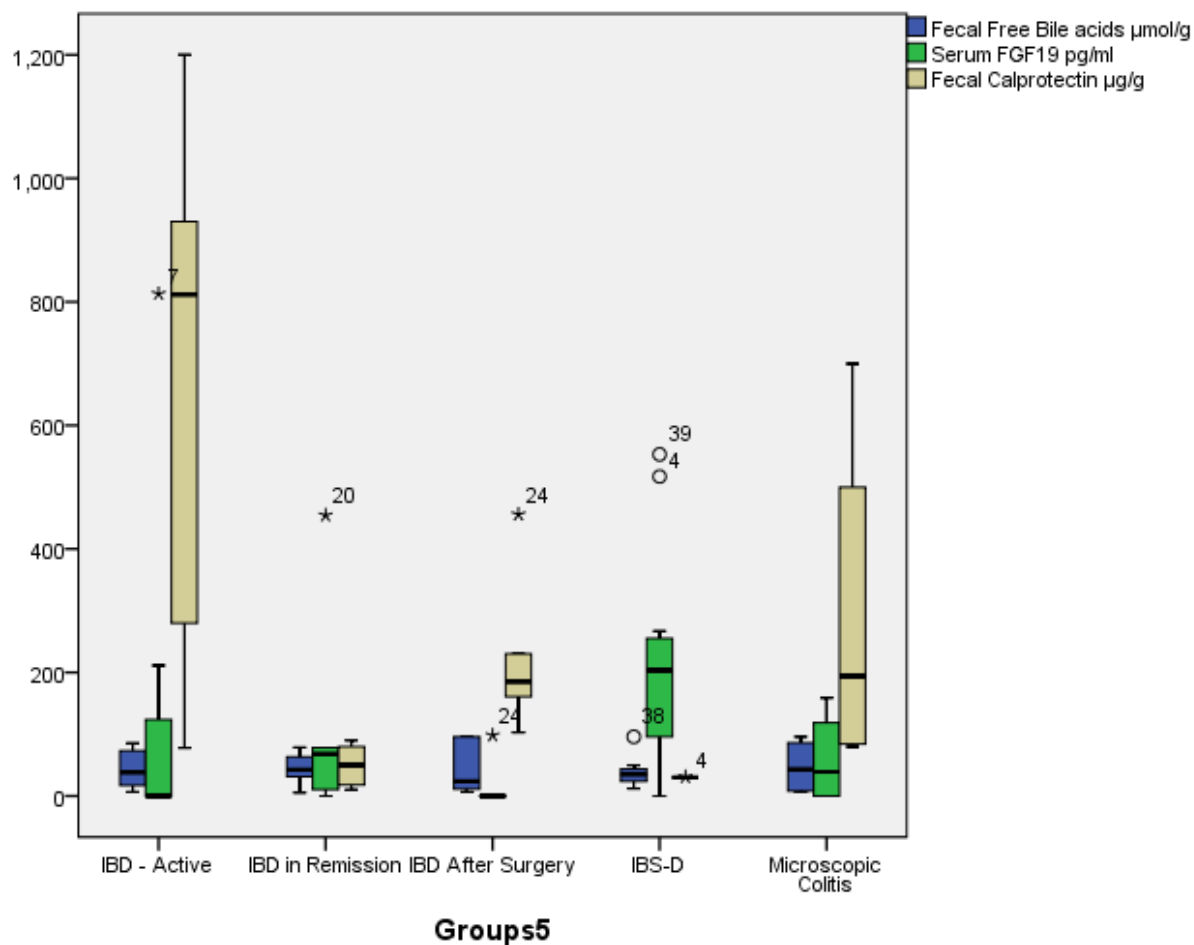
FGF-19 корелация с МК	Некоригиран (Uncorrected)	Коригиран за възраст, CRP и ФКП
Колагенов слой в μm (n=14)	$r=-0.489$, $p = 0.002$	$r = -0.414$, $p = 0.014$

Таблица 7-61. Корелация на FGF-19 с колагеновия слой (с или без корекция)

7.5.9 Маркери за МЖК (FGF-19 и TFFBA) спрямо ФКП

Основните характеристики на FGF-19, TFFBA и ФКП са отразени на (Фигура 29), където стойностите на ФКП са най-високи при IBD active и МК, последвани от завишени (mean 375 $\mu\text{g/g}$), спрямо IBD в ремисия и IBS-D. Относно стойностите на FGF-19 - намерихме ниски стойности при IBD-Active, IBD в ремисия, IBD след хирургия и МК, като високи средни стойности намерихме при IBS-D ($p < 0.001$). Не открихме потенциална асоциация между нивата на ФКП и стойностите на FGF19 при тези групи пациенти ($p = 0.058$), като нивото на статистическата значимост е малко над горната граница. Не установихме и корелация между стойностите на

FGF-19 и ФКП ($r = -0.173$, $p = 0.058$). Не открихме значима разлика между нивата на TFFBA между различните групи пациенти (Таблица 7-33).



Фигура 29. Вох-plot анализ на стойностите на FGF19, TFFBA и ФКП при различните групи пациенти

7.5.10 Корелация между FGF-19 със stool index (SI) и честота на изхожданията (със или без корекция на маркерите за чревното възпаление)

Анализът показва, че серумния FGF-19 при всички групи пациенти с хронична диария дава силна отрицателна корелация с маркерите за тежест на диарията ($r = -0.800$, $p < 0.001$). Нивата на FGF-19 бяха сигнификантно по-ниски на тези с IBD и МК спрямо тези с IBS-D и здравите контроли ($p < 0.001$). При унивариабилен Pearson вариационен анализ, ние открихме

сигнификантна корелация между FGF-19 и честота на докладвани изхождания дневно и SI при всички пациенти с хронична диария ($r = -0.800, p < 0.001$; $r = -0.739, p < 0.001$). След като направихме корекция, чрез отстраняване на маркерите на чревно възпаление (ФКП, CRP и възрастта заради МК) от калкулациите, ние открихме дори по-силна обратна корелация между FGF-19 със SI и честотата на изхожданията независимо от възпалителните компоненти ($r = -0.718, p = 0.001$; $r = -0.792, p = 0.001$). Установи се слаба корелационна и асоциация между стойностите на FGF-19 и времетраенето на диарията при всички пациенти ($r = -0.255, p = 0.005$; $r = -0.223, p = 0.016$). Не се установиха никакви значими връзки или корелации между FGF-19 и CDAI ($r = 0.063, p = 0.706$), Mayo score $r = -0.141, p = 0.427$), EMS ($r = -0.120, p = 0.499$), Броя на лимфоцитите в мукозата ($r = -0.208, p = 0.211$) и фекалните жлъчните киселини ($r = -0.107, p = 0.243$)(Таблица 7-62).

FGF-19 Корелация	Некоригиран (Uncorrected)	Коригиран за възраст, CRP и ФКП
Годни	$r = -0.191, p = 0.036$	-
Пол	$r = 0.054, p = 0.558$	$r = -0.148, p = 0.111$
Stool Index (SI)	$r = -0.739, p < 0.001$	$r = -0.718, p = 0.001$
Брой изходания/дневно	$r = -0.800, p < 0.001$	$r = -0.792, p = 0.001$
Продължителност на диарията	$r = -0.255, p = 0.005$	$r = -0.223, p = 0.016$
Mayo Score (full)	$r = -0.141, p = 0.427$	-
Endoscopic Mayo Score	$r = -0.120, p = 0.499$	
CDAI	$r = 0.063, p = 0.706$	$r = 0.262, p = 0.129$
Брой лимфоцити в мукозата	$r = -0.208, p = 0.211$	$r = -0.124, p = 0.477$
CRP	$r = -0.097, p = 0.292$	-
Фекални жл. киселини ($\mu\text{mol/g}$)	$r = -0.107, p = 0.243$	$r = -0.146, p = 0.115$
Fecal calprotectin	$r = -0.173, p = 0.058$	-

Таблица 7-62. Корелация на FGF-19 с другите показатели (със и без корекция на маркерите за чревното възпаление и възрастта)

За целите на корелационния анализ FGF19 индексите бяха трансформирани в естествен логаритъм (Таблица 7-62).

7.6 БК и УК в ендоскопска ремисия и налична необяснима хронична водниста диария

При тази група пациенти от IBD в ендоскопска ремисия установихме (n=21) пациенти (БК са n=9 (43%) и УК n=12 (57%) в ремисия), които съобщаваха при проведената анкета за повече от 4 седмици за над 3 изхождания дневно. При тези пациенти изследвахме ФКП, който е със средни стойности в групата (mean) $81.33\mu\text{g/g} \pm 39.70 \text{ SD}$ и значително по-нисък спрямо IBD active ($p < 0.001$). Не се установи сигнификантна разлика в стойностите на ФКП ($81,33\text{b } \mu\text{g/g} \pm 39.70$) при IBD в ремисия спрямо здравите контроли ($43\text{b } \mu\text{g/g} \pm 23\text{SD}$) ($p = 0.21$). Не наблюдавахме сигнификантна разлика в стойностите на CRP спрямо здравите контроли ($p = 0.2$).

Беше проведен H₂-дихателни тест с лактулоза при n=13 пациента IBD в ремисия, като само при n=1 пациент установихме скъсено оро-цекално транзитно време и не установихме статистическа значимост спрямо другите групи при които е проведен H₂-дихателен тест ($p = 0.584$). Средният брой на изхождания на пациентите в групата IBD в ремисия е 5.86/дневно, на фона средни стойности на ФКП $81 \mu\text{g/g}$, като n=17/21 (81%) при установена ендоскопска и биохимична ремисия.

7.6.1 FGF19 и IBD в ремисия с необяснима хронична диария

Поради необяснимата хронична диария изследвахме биомаркерите за МЖК (FGF19 и TFFBA) при тази група пациенти в ремисия, като евентуална причина за диарийния синдром и установихме, че пациентите с IBD в ремисия n=8/9 (88%) с БК имат стойности на FGF-19 $\leq 114.07 \text{ pg/mL}$. и n=8/12 (66%) с УК има стойности по-ниски от FGF-19 $< 114.07 \text{ pg/mL}$., като това прави общо 16/21 (76%) пациентите в IBD ендоскопска ремисия имат биохимични данни за МЖК, ако използваме FGF-19 $\leq 114.07 \text{ pg/mL}$. за cut-off. От получените резултати анализирахме, че (median) и 25-75th

percentile на FGF-19 е 0.009 (0.005- 78.142) при IBD ремисия групата, което е значително по-ниско от това на IBS-D и на здравите контроли ($p < 0.001$)(Таблица 7-63).

	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
Брой пациенти, n (%)	30 (25)	21 (17.5)	21 (17.5)	23 (19.2)	14 (11)	11 (9.2)	$p = 0.435$
Stool Index (SI), mean \pm SD	49a,b \pm 21	33a,c \pm 13	58b \pm 23	31c \pm 18	63b,d \pm 25	6e \pm 3	$p < 0.001$
Stool frequency/day, mean \pm SD	8a,b \pm 3	6a,c \pm 2	9b \pm 3	5c \pm 2	9b,d \pm 3	1e \pm 1	$p < 0.001$
Фекални жл. киселини, mean \pm SD	42.000a \pm 19.453	37.576a \pm 14.135	40.195a \pm 20.955	40.882a \pm 20.363	40.627a \pm 25.42	44.072a \pm 13.386	$p = 0.315$
FGF19, median (25-75th percentile)	0.009 (0.005-211.406)	0.009 (0.005-78.142)	0.005 (0.002-0.012)	266.900 (78.142-831.000)	0.010 (0.004-78.142)	463.000 (50.080-858.000)	$p < 0.001$
FGF19 (mean \pm SD)	263.57 \pm 582.22	367.21 \pm 778.60	57,10 \pm 233,99	447,55 \pm 421,24	403,67 \pm 1173,69	585,65 \pm 579,72	$p=0.000$

Таблица 7-63. Стойностите на FGF-19 спрямо SI, брой изхождания при всички групи пациенти

При стойностите на TFFBA не открихме сигнификантна разлика между тези на IBD в ремисия и здрави контроли, както и между останалите групи пациенти ($p = 0.315$).

7.6.2 Диагностична точност на FGF-19 за откриване на МЖК при IBD в ремисия с необяснима хронична диария

Зададохме стойност от $FGF19 \leq 114,07 \text{ pg/mL}$. за прагова (Cut-off) сравнена с контролната група (зdravi доброволци) пациенти. При проведения анализ се откриха, че 76% от пациентите с IBD в ремисия с необяснима диария са под тази горна-граница, което кореспондира с това, че МЖК е ко-фактор в патогенезата на диарията при тези 76% от пациентите в ремисия с над 3 изхождания дневно. От проведения ROC анализ наблюдавахме AUC 0.771 с чувствителност от 76.2% и специфичност от 72.7%, PPV от 84.21% и NPV от 61.54% за откриване на МЖК в тази група пациенти ($p = 0.013$)(Таблица 7-33).

7.6.3 Корелация на FGF-19 спрямо Stool Index при пациенти в IBD ремисия

При тази група пациенти установихме, наличие на обратна корелация между серумните стойности на FGF-19 и броя на изхожданията дневно чрез Pearson корелационен анализ ($r = -0.800$, $p < 0.001$). След това проведохме корекция, чрез изключването на факторите „възпаление“ и възрастта (ФКП, CRP и Age) от калкулациите и отново получихме корелация между FGF-19 и броя на изхожданията при тази група пациенти ($r = -0.792$, $p = 0.001$).

FGF-19 Correlation	Uncorrected	Corrected for age, CRP and fecal calprotectin
Stool Index (SI)	$r = -0.739, p < 0.001$	$r = -0.718, p = 0.001$
Stool frequency/day	$r = -0.800, p < 0.001$	$r = -0.792, p = 0.001$

Таблица 7-64. FGF-19 корелира със SI и честотата на изхождания при IBD ремисия. Проведена корекция на възпалителните компоненти (corrected)

7.7 БК и УК след хирургични интервенции (десностранна хемиколектомия, тънкочревна резекция или IPAA)

В групата изследвани пациенти с хронична водниста диария $n=72$ бяха с доказано при предходни хоспитализации IBD. От тях $n=51(70\%)$ неоперирани и $n=21(30\%)$ – претърпели чревни резекции – десностранна хемиколектомия, резекция на терминалния илеум или тотална проктоколектомия с илео-J-pouch-анална анастомоза (IPAA). От изследваните неоперирани с IBD $n=21$ (42%) бяха в ендоскопска и биохимична ремисия (нормални ФКП и CRP) и $n=30(58\%)$ бяха с ендоскопска и биохимична активност към момента на вземането на пробите за FGF19 и TFFBA (**Таблица 7-65**). От всички оперираните $n=21$ IBD пациенти с УК след тотална проктоколектомия с IPAA и активно възпаление – паучит и повишен ФКП са $n=4$ (20%); с Болест на Крон и резекция на терминалния илеум (IR-CD) $n=17(80\%)$ от които $n=8(47\%)$ в ендоскопска ремисия (Rutgeerts score $\leq i1$) и $n=9$ (53%) с ендоскопски рецидив (Rutgeerts score $\geq i2$) към момента на пробовземането за FGF-19 и TFFBA.

		Групи			Общо
		IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	
	Не-резицирани	18	12	0	30
	IPAA (J-Pouch)	0	0	4	4
Общо		18	12	4	34

Таблица 7-65. Брой пациенти оперирани чрез J-pouch анална анастомоза (IPAA) сравнено с другите пациенти от IBD групите.

становихме, че съществува статистическа разлика между $n=17$ (44.2%) с БК в активност и тези с БК в ремисия след проведен Chi-Square test ($p=0.000$) (виж. **Таблица 7-66**) и (**Таблица 7-67**).

		Групи			Общо
		IBD - Active	IBD in Remission	IBD оперирани	
Crohn Surgical Status	Non-Resected (NR-CD)	12	9	0	21
	Ileal Resected (IR-CD)	0	0	17	17
Total		12	9	17	38

Таблица 7-66. Разпределение на болните с БК, които са след илеална резекция спрямо тези с БК в ремисия и активност

Chi-Square Tests	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	38,000 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	52,257	2	,000
Linear-by-Linear Association	30,286	1	,000
N of Valid Cases	38		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,03.

Таблица 7-67. Chi-Square Test за откриване на взаимовръзка при маркерите на чревно възпаление между групите с БК в активност и ремисия.

7.7.1 Разпределение по типа операция и стойностите на FGF-19

На (Таблица 7-68) са представени стойностите на всички пациенти с IBD според типа на заболяването – БК или УК, според активността, според стойностите на ФКП, EDN/EPX, FGF-19 и TFFBA, като са сравнени със здравите контроли. При n=16/17 от БК след резекция имат по-ниски стойности от FGF-19 ≤ 145 pg/mL., и средната стойност (mean) е 64.759±260.11 pg/mL., докато (median) е 0.009 pg/mL., което говори, че 16

от тези 17 пациента имат тежък МЖК спрямо контролната група ($p < 0.001$).

	FGF19 Mean \pm SD, Median	TFFBA Mean \pm SD,	FCP Mean \pm SD,	EDN/EPX Mean \pm SD,
All IR-CD (remission and active), n=17	64.759 \pm 260.11 0.009	45.01 \pm 19.2	365 \pm 280	1196 \pm 879
IR-CD Remission, n=8	16.089 \pm 120.11 0.008	43.28 \pm 23.1	140.55 \pm 95	288 \pm 200
IR-CD Active, n=9	12.145 \pm 112.11 0.009	46.67 \pm 29.2	567.68 \pm 354	2000 \pm 1452
All NR-CD (remission and active), n=21	144.129 \pm 114.11 0.008	46.36 \pm 32.7	550 \pm 244	2210 \pm 1252
NR-CD Active, n=12	256.023 \pm 75.55 95.034	39.02 \pm 25.2	610+400	2139 +980
NR-CD Remission, n=9	113.00 \pm 85.55 0.008	37.87 \pm 35.2	101 \pm 21	222 \pm 131
UC Active, n=18	262.94 \pm 200.47 0.008	38.97 \pm 17,67	844 \pm 500	2947 \pm 1459
UC Remission, n=12	112 \pm 79.8 39.67	37.99 \pm 18.5	66 \pm 43	554 \pm 300
IPAA , n=4	24.58 \pm 20 0.006	39.27 \pm 12.82	417.75 \pm 281	2398. \pm 1123
Здрави контроли (controls),n= 11	585.65 \pm 579.72 463.00	42.56+21.65	43 \pm 23	179 \pm 118

Таблица 7-68. Дескриптивни стойности на FGF19, TFFBA, FCP и EDN/EPX при здрави контроли, пациенти с IBD след хирургична интервенция спрямо операцията и активността на заболяването.

При целенасочен суб-анализ на пациентите с БК с резекция в ремисия $n=8$ (IR-CD remission), установихме средни стойности на FGF-19 от 16.089 ± 120.11 pg/mL., като медианата (median) е 0.008 pg/mL., и съответно $n=7/8$ от пациентите имаха $FGF19 \leq 114,07$ pg/mL., което говори за висока степен на МЖК при пациенти в тази група. При болните с резекция на терминалния илеум с ендоскопски рецидив установихме стойности на $FGF19 \leq 136,07$ pg/mL. при $n=9/9$ и средни стойности на FGF19 в групата 12.145 ± 112.11 pg/mL., като медианата е 0.009 pg/mL., което сред най-ниските получени резултати спрямо здравите контроли и останалите групи ($p < 0.001$). При всички пациенти с БК, без резекция на терминалния (активност и ремисия) $n=21$, средни стойности на FGF19 144 pg/mL., и само при $n=14/21$ пациента, които да са със актуални стойности на FGF19 под използвания cut-off ≤ 136 pg/mL., което говори, че степента на МЖК при тази група е по-малка сравнение с тази на резецираните БК ($p = 0.023$). Стойностите на медианата са 0.008 pg/mL., като причина за по-ниски стойности от $FGF19 \leq 136$ pg/mL. може би е по-големият брой случаи (14 срещу 7 пациента с или без МЖК).

При извършването на суб-анализа при групата на не-ресецираните с БК (NR-CD) в ендоскопска активност $n=12$, откриваме, че $n=7/12$ (58%) пациента имат стойности по-ниски от FGF19 под използвания cut-off ≤ 136 pg/mL., средни стойности на групата са 256.023 ± 75.55 pg/mL, което е сигнификантно по-високо от останалите групи ($p = 0.004$), като дори медианата показва стойности от 95.034 pg/mL. Това би могло да се обясни с факта, че болните с БК без резекция и ендоскопска активност имат средно по-високи стойности на FGF-19, но повече от половината са с МЖК според определените cut-off от FGF-19 136 pg/mL.

При групата с БК, без резекция и в ендоскопска ремисия (NR-CD) откриваме $n=9$ пациента, като при $n=7/9$ (77%) са с установени стойности FGF-19 под $\leq 114,07$ pg/mL., средни стойности от 113.00 ± 85.55 pg/mL., и

медианата е 0.008 pg/mL., което показва, че 77% от не-ресицираните БК в ремисия имат данни за МЖК ($p < 0.001$).

При пациентите с УК в активност $n=18$, не-оперирани, (ендоскопска и биохимична активност – виж. стойности на ФКП и EDN/EXP от (Таблица 7-68), установяваме, че средните стойности на FGF19 от 262.94 ± 200.47 pg/mL., които са значително по-високи над определения cut-off от 136 pg/mL., като все пак медианата е 0.008 pg/mL и $n=14/18$ (77%) от болни имат по-ниски стойности от cut-off, но 77% от пациентите имат МЖК, което може да означава, че възпалението играе патофизиологична роля в стойностите на FGF-19. При сравнителния анализ, групата на УК в активност показва сигнификантна разлика в стойностите на FGF19 спрямо здравите контроли ($p = 0.013$).

При суб-анализа на групата с УК в ремисия, без резекция $n=12$, наблюдавахме средни стойности на FGF-19 112 ± 79.8 pg/mL., и стойности на медианата от 39.67 pg/mL., като $n=8/12$ (66.6%) болни имаха стойности на FGF-19 по-ниски от $FGF19 \leq 114,07$ pg/mL. (използвания за cut-off). Тези резултати отново говорят, за наличие на МЖК при 66% от пациентите с УК в ремисия без хирургични операции, ако спазваме установените от нас cut-off, като резултатите показват значима разлика спрямо здравите доброволци ($p < 0.001$).

При пациентите с УК след проведена ИРАА $n=4$, установяваме, че всички $n=4/4$ пациенти има стойности на FGF19 ≤ 98.01 pg/mL., средните стойности са 24.58 ± 20 pg/mL., поради което и нашите cut-off за тази група са по-ниски, като медианата е 0.006 pg/mL. От получените резултати, се установява, че пациентите с ИРАА имат тежко изразена МЖК спрямо здрави контроли ($p < 0.001$), което потвърждава патофизиологичните механизми на ролята на FGF-19 в хроничната диария.

Според изследваните взаимовръзки и данните от здравите контроли $n=11$, които са със средна стойност от FGF-19 от 585.65 ± 579.72 pg/mL.,

медиана от 463.00 pg/mL. и само n=3/11 пациента са под FGF19 \leq 150 pg/mL., като тримата здрави контроли са с конкретни стойности от 0.25 pg/mL., 10.00 pg/mL. и 50.08 pg/mL., а всички останали здрави доброволци са над FGF19 $>$ 150 pg/mL., това показва, че тестът е достатъчно чувствителен да установява пациенти с МЖК (Таблица 7-68).

7.7.2 Корелация между FGF-19 и тежестта на диария при IBD след хирургична операция

При провеждането на корелационен анализ (Pearson Correlation) между стойностите на FGF-19 и тежестта на диарията (определя чрез брой изхождания дневно и SI), се видя, че има умерена отрицателна корелация, която е сигнификантна ($r=-0.544$, $p = 0.011$; $r=-0.593$, $p = 0.005$) (виж. Таблица 7-69). За целите на корелационния и линеен регресионен анализ FGF19 индексите бяха трансформирани в естествен логаритъм.

Корелационен анализ на FGF-19 и клиничните индекси за тежест на диарията				
		lnFGF19	Stool Index (SI)	Stool frequency/day
lnFGF19	Pearson Correlation	1	-,544*	-,593**
	Sig. (2-tailed)		,011	,005
	N	21	21	21
Stool Index (SI)	Pearson Correlation	-,544*	1	,942**
	Sig. (2-tailed)	,011		,000
	N	21	21	21
Stool frequency/day	Pearson Correlation	-,593**	,942**	1
	Sig. (2-tailed)	,005	,000	
	N	21	21	21

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Таблица 7-69. Корелационен анализ на FGF-19 и SI (stool frequency/day) при IBD резидирани

7.7.3 Маркери на чревно възпаление при оперирани IBD болни

Пациентите с БК в ремисия и след IR-CD n=8 имат значимо по-високи средни стойности на ФКП (140.55 ± 95 μ g/g), в сравнение със

съответните стойности на здравите контроли $n=11$ ($43\pm 23 \mu\text{g/g}$) ($p=0.004$). При сравнението на IR-CD в ремисия и след операция $n=8$ ($140.55\pm 95 \mu\text{g/g}$) спрямо цялата група IBD в ремисия без операция от $n=21$ със средна стойност на ФКП ($81,33 \mu\text{g/g}$), има сигнификантна разлика в стойностите на ФКП ($p = 0.023$). Същата група пациенти с БК в ремисия и след резекция на илеум имат средни стойности на EDN/EPX от 288 ng/mL. , докато здравите контроли имат средни стойности от 179 ng/mL. Проведохме “Levene’s Independent sampe t-Test” и установихме, че няма разлика между стойностите на здравите контроли и EDN/EPX IR-CD в ремисия, което говори за добрата диагностична точност на EDN/EPX за чревно възпаление при IBD резецирани болни ($p = 0.285$) (Таблица 7-70). При сравнение на средните стойности EDN/EPX на цялата група на IBD в ремисия без операция $n=21$ (412.152 ng/mL.) спрямо IR-CD в ремисия след операция (288 ng/mL.) не установяваме сигнификантна разлика между двете групи ($p = 0.526$), което говори за добрата диагностична точност на EDN/EPX за определяне на чревното възпаление при IBD оперирани болни.

При комбинираната група IBD resect $n=21$ болни с БК и УК (IR-CD и ПРАА) стойностите на ФКП $375 \mu\text{g/g}$ и EDN/EPX 1425.086 са повишени и статистически различни спрямо IBD в ремисия ($p = 0.008$), IBS-D ($p = 0.012$), МК ($p = 0.004$) и HS ($p = 0.023$), защото групата е хетерогенна и някои от пациентите след операцията имат рецидив (Rutgeerts score $\geq i2$) или паучит. При всички останали суб-групи стойностите на END/EPX при активност и ремисия корелират и следват тези на ФКП, като всичките отразяват добра зависимост спрямо здравите контроли ($p < 0.05$) (Таблица 7-70). Средните стойности на CRP при пациенти с IBD след хирургична интервенция бяха 0.44 mg/dL , което не показва сигнификантна разлика с други изследвани групи ($p = 0.163$).

Независим тест за бройката - Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Equal variances assumed	5,172	,036	1,103	17	,285	109,0955	98,9126	-99,5919	317,7828
	Equal variances not assumed			,975	8,601	,356	109,0955	111,9153	145,8738	364,0647

Таблица 7-70. Independent Samples t-Test между IR-CD в ремисия и здрави контроли за EDN/EPX

7.7.4 Корелация между EDN/EPX и CDAI при оперирани болни

След проведен корелационен анализ между стойностите на EDN/EPX и CDAI при пациенти с БК и след резекция (IR-CD) се установи умерена позитивна корелационна зависимост ($r=0.485$, $p = 0.049$), поради което EDN/EPX може да бъде използван за проследяване на болни с IBD след хирургична интервенция за тяхната активност и чревно възпаление (виж. **Таблица 7-71**).

Корелация между CDAI и EDN/EPX			
		CDAI	Fecal EDN/EPX (ng/ml)
CDAI	Pearson Correlation	1	,485*
	Sig. (2-tailed)		,049
	N	17	17
Fecal EDN/EPX (ng/ml)	Pearson Correlation	,485*	1
	Sig. (2-tailed)	,049	
	N	17	29

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Таблица 7-71. Корелационна зависимост между EDN/EPX и CDAI при оперирани БК болни (ремисия и активност).

8. ДИСКУСИЯ

Алгоритъм при хронична диария

Хроничната диария е съществен аспект от ежедневната работа на гастроентеролога и използването на правилен алгоритъм и стратегия значително подобрява процеса до достигане на диагнозата. От своя страна тестовете за поставяне на диагнозата се разделят на инвазивни и не-инвазивни (биомаркери). Ендоскопските изследвания са съществен елемент за поставяне на диагнозата и хистологична верификация, но част от пациентите могат да бъдат диагностицирани чрез не-инвазивни методи, за да се спести време и ресурс. В болшинството от случаите достигането до диагнозата при пациентите с хронична диария се постига чрез последователно използване на не-инвазивни и инвазивни изследвания, след което болестната активност може да бъде мониторирана чрез неинвазивни биомаркери. Основен проблем при пациентите с функционални заболявания с диария е това, че те съобщават за голям брой воднисти изхождания дневно, които не корелират с тяхното общо клинично състояние и лабораторни показатели, което налага прилагането на различни не-инвазивни тестове за да степенува правилно тежестта на диарията при тях.

За да се подберат правилно групите пациенти използвахме въпросник (анкета) който пациентите попълваха на хартия. Анкетата включва в себе си валидираните скали за форма на изпражненията (Bristol stool scale), честота на изхожданията, гастроинтестинални симптоми, ROME IV критерии за IBS както и много други въпроси по отношение на прием на медикаменти и придружаващи заболявания. На базата на събраните данни проведохме последователна серия от неинвазивни изследвания чрез които да подберем нужните пациенти по групи, за да предложим различни образни или ендоскопски изследвания и разработихме схематична стратегия за подход към пациенти с хронична диария както и блок-схема с

практичен алгоритъм „стъпка по стъпка“ за улеснение на гастроентеролога.

Микроскопски колит

Микроскопския колит (МК) е възпалително чревно заболяване протичащо с тежка хронична водниста диария с вероятно мултифакторна етиология, следствие на абнормна имунна реакция при предразположени индивиди, провокирана от различни луменни фактори. Нашата хипотеза беше, че жлъчните киселини играят ключова роля в патогенезата на диарията и целта ни беше да изясним ролята на FGF19, EDN/EPX и ФКП, като биомаркери при това заболяване.

МК се смята от някои автори за нов член на групата хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ, IBD) и честота му в Северните държави нараства значително през последните 10 години [19]. В нашата кохорта от 109 последователни пациента с хронична водниста диария, които са отговорили на критериите по разработения от нас въпросник (анкета) и постъпателен диагностичен алгоритъм, диагностицирахме след илеоколоноскопия и множествени биопсии $n=14$ (12.8%) пациента с МК. От тези $n=14$ пациента, $n=12$ (85%) бяха с колагенов колит (КК) и $n=2$ (15%) бяха с лимфоцитен колит (ЛК). Честота в нашата кохорта съответства с тази на последните публикувани данни от наличните мета-анализи [32][37], но трябва да се има предвид, че нашата група пациенти не е репрезентативна за Р. България, защото Клиниката по Гастроентерология на УМБАЛ Царица Йоанна е реферативен център за пациенти с ХВЧЗ и това може значително да повлияе епидемиологичната картина. Нужни са по-големи епидемиологични проучвания в цялата страна, за да се определи дали наистина съществува докладвания от предходни проучвания „Север-Юг“ градиент в честотата и разпределението на МК. Оценихме демографските показатели и

клиничните характеристики на диаричния синдром при МК. Установихме, че $n=11/14$ (78%) от пациентите са жени на средна възраст $60\text{г.} \pm 17\text{г.}$ и значително по-висока средна възраст спрямо останалите групи изследвани пациенти и преобладаване на женския пол ($p = 0.021$). При $n=10/14$ (72%) са докладвали за BSS 7 (течни) изхождания, средният брой на изхождания дневно при МК е доста висок с 9 изхождания/дн. ± 3 , като Stool Index е 63 ± 25 , броят пациентите с изхождания през нощта е $n=9/14$ (64%), което е статистически значимо и говори за тежка степен водниста диария ($p < 0.001$). При пациентите с МК не намерихме изменения в стандартните лабораторните кръвни и биохимични показатели. При всички пациенти с хронична водниста диария сме провели илеоколоноскопия и при тези при които не е открита сигнификантна патология сме взели множествени биопсии от тънко и дебело черво. При сравнителния анализ се установява, че на $n=7/14$ (50%) от МК пациенти са описани огнищни неспецифични огнищни „минимални“ мукозни изменения (ерозии, хеморагии, лесно ранима лигавица) по време на ендоскопията, които изменения са биопсирани целенасочено. При всички биопсирани пациенти хистологичният резултат от биопсиите на дебелото черво е разгледан от двама независими патоанатома, и е проведено измерване на дебелината на колагеновия слой посредством окуляр микрометър и преброяване броя на интраепителните лимфоцити на зрително поле, за да се постави диагнозата МК.

В настоящето проучване направихме оценка на приема на медикаменти при всички 109 пациентите и установихме, че $n=9$ са приемали НСПВС и от тях $n=7/9$ (77.7%) са диагностицирани с МК, което е статистически значимо ($p < 0.001$). НСПВС се оказват значим рисков фактор провокиращ активирането МК и развитието на тежка диария, което корелира с данните от световната литература [130]. При анализа за прием на инхибитори на протонната помпа (ИПП) установихме, че $n=23$ са приемали ИПП от

n=109 пациента с диария, а от тях n=12/23 (52.1%), са диагностицирани с МК, или общо 85% от пациентите с МК приемат ИПП и/или НСПВС, което е значителен рисков ко-фактор за индуциране на МК ($p < 0.001$). Данните от нашето проучване за приема на медикаменти при МК съответстват с докладваните до момента резултати [131][132].

В групата диагностицирани n=14 МК установихме сигнификантно завишени средни стойности на ФКП 221 μ g/g (изследван преди ФКС), които са значително по-високи от средните стойности на ФКП при здрави контроли и IBS-D групата ($p = 0.047$). Това говори за налично чревно възпаление при пациентите с МК и можем да заключим, че при пациенти с леко завишени стойности на ФКП и хронична диария винаги трябва да се биопсира дебелото черво и да се изиска от патологата целенасочено да измери колагеновия слой или да преброи IEL.

Средните стойности на EDN/EPX във фекалиите не показаха сигнификантна разлика спрямо здрави контроли, което говори, че вероятно еозинофилите не вземат участие във възпалението при МК, докато неутрофилите имат роля в патогенезата на възпалението при МК както това е доказано от други колективи [96]. В бъдеще ще се търсят различни биомаркери за МК вероятно взаимосвързани с лимфоцитната активност и синтеза на субепителния колагенов слой, които биха били потенциално специфични за МК, за да го различим от БК или УК.

В наблюдаваната от нас група от МК установихме, че n=10 (71.4%) от пациентите с МК отговарят на ROME IV критериите за IBS-D. Това говори за голямо припокриване (overlap) в клиничните симптоми на МК и IBS-D. Това в повечето случаи би могло да подведе гастроентеролога и той да класифицира пациента, като СДЧ и по този начин да го лиши от ефективно съществуващо лечение.

При изследваните болни с МК установихме подчертано ниски средни (median) серумни нива на FGF19 0.010 pg/mL., като разликата със здрави

контроли е сигнификантна ($p = 0.006$). Приехме cut-off от FGF19 от ≤ 30.04 pg/mL с чувствителност от 71.4%, специфичност от 81.8% за откриване на хронична диария при МК дължаща се на МЖК спрямо здрави контроли ($p = 0.006$). При обработените данни установихме, че $n=10/14$ (71%) пациенти с МК имат данни за МЖК според нашите гранични стойности (cut-offs), което прави МЖК важен аспект от патогенезата на хроничната диария при МК.

Всички тези диагностични тестове са от голямо значение, защото съществува ефективно лечение на МК с Будезонид 9мг/дн (първа линия на лечение), което се е доказало в различни рандомизирани клинични проучвания (RCT) и е залегнало в Американските препоръки за лечение на МК публикуван през 2016 [48][49]. През месец Юли 2019 беше публикувано отворено мултицентрично проучване (COLCO) за лечение на МК с Беклометазон дипропионат с освобождаване в колона [50]. При това проучване $n=30$ пациента са били лекувани с Беклометазон 10мг.дн в продължение на 1 месец, след това 5мг. за още един месец. На 8 седмица е постигната ремисия от 70% и 77% от пациентите с МК [50]. Лечението на МК с хелатори на ЖК (холестирамин) също има своето място за лечение на МК и е залегнало като втора линия на лечение в приетите консенсуси [48][49].

Малабсорбция на жлъчни киселини

Малабсорбцията на жлъчни киселини (МЖК) е състояние при което по-голямо количество от жлъчни киселини (ЖК) в тънкото черво не се реабсорбират (илеума) и попадат в дебелото черво, където предизвикват тежка водниста диария. МЖК може да възникне при много състояния засягащи терминалния илеум (като БК, тънкочревна резекция и др.), но може и да бъде „идиопатична“, което създава много диагностични затруднения в ежедневната практика, защото в България няма

съществуващ утвърден тест за МЖК. В съвременната литература цитираните данни за чувствителност и специфичност по отношение на различните тестове за МЖК варират широко в зависимост от селекцията на тестваните пациенти и степента на активност на дадено заболяване. Най-старият и утвърден тест за МЖК е сцинтиграфия с ⁷⁵Selenium homotaurocholic acid test (SeHCAT) който се провежда в звената по нуклеарна медицина. На този етап и на базата на нашите познания, нямаме налична информация на територията на Р. България да се провежда този тест. Със своята трудоемкост, продължителност, цена, излагане на радиоактивно лъчение, употребата на SeHCAT е ограничена в много Европейски държави и не намира широко приложение в ежедневната практика. Поради тази причина решихме да тестваме и да сравним различни алтернативни не-инвазивни (серумни и фекални) тестове за МЖК при пациенти с различно естество на хроничната диария в Катедрата по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“. Поставянето на диагнозата е от съществено значение, защото има налични ефективни хелаторни медикаменти, които могат да предотвратят симптомите на МЖК.

В нашето проучване извършихме оценка на приложимостта на серумния fibroblast growth factor 19 (FGF-19) и на фекалните свободни жлъчни киселини „total free faecal bile acids“ (TFFBA) за откриване на МЖК при пациенти с хронични възпалителни заболявания на червото (ХВЗЧ), като болест на Крон и Улцерозен Колит, микроскопски колит (МК) и синдром на дразнимото черво (СДЧ). Извършихме изследванията чрез количествен имуноензимен тест (ELISA), тип „сандвич“ с поликлонални антитела, както и чрез колориметричен тест за фекалните ЖК, и ги сравнихме със здрави контроли. От получените резултати, средните нивата на FGF19 бяха сигнификантно по-ниски при пациенти с ХВЗЧ и МК спрямо тези със СДЧ и здравите контроли ($p < 0.001$), което

корелира с резултатите в световната литература и е признак за налична МЖК [59][73]. Установихме взаимовръзка между получените резултати за FGF19 при различните групи пациенти с хронична диария и тежестта на диарията определена от валидираните клинични индекси за оценка болестната активност. Направихме сравнение между FGF-19 срещу TFFBA за определяне на МЖК, като установихме, че FGF-19 има по-добра информативна стойност при пациенти с хронична диария, което оправдава приложението му в клиничната практика. При всичките изследвани пациенти с хронична диария в нашето проучване, определихме прагови стойности (cut-off) на $FGF19 \leq 136,7 \text{ pg/mL.}$, за откриване на МЖК. От получените резултати намерихме, че FGF19 има обща диагностична точност с чувствителност от 72.7% и специфичност от 72.4% за откриване на МЖК при пациенти с хронична диария, което води до висока предсказваща точност за МЖК при 72% от пациентите с МК и IBD. При тези използвани стойности (cut-offs) определихме, че 65/109 (59,6%) от нашите изследвани пациенти имат налична МЖК, докато 44 пациента (40.4%) нямат МЖК сравнени с получените стойностите на здравите контроли в това проучване. Не открихме сигнификантна разлика в нивата на FGF19 между пациентите със СДЧ и здравите контроли. Ниските нива на FGF-19 силно корелират с броя на изхожданията дневно и Stool index (SI) на изследваните пациенти, което може да се тълкува, че FGF-19 би могъл да бъде обективен маркер за измерване на тежестта на диарията независимо от болестната активност (възпалението) при пациентите с МК и IBD. Не установихме сигнификантна разлика в резултатите на TFFBA между различните групи и спрямо здравите контроли (здрав доброволци). В скорошно публикувано проучване от Lenisek и сътрудници, се съобщава, че FGF-19 е много добър маркер за определяне на МЖК при пациенти с ХВЗЧ и има предимства, защото е бърз и лесен за употреба биомаркер (ELISA) [64].

Ние намерихме, че пациенти с ХВЗЧ в активност (релапс) имат леко завишени средни стойности на серумния FGF-19 от 263.57 pg/mL. и затова използвахме cut-off от <136 pg/mL (други автори използват cut-off от <145 pg/ml). Установихме чувствителност от 70% и специфично от 72.7%, в тази група пациенти, като това може да се дължи на факта, че тази група е с най-изразено чревно възпаление (ФКП и EDN/EPX). Това може да повлиява концентрацията на FGF19, следователно да се нуждаем от по-високи прагови стойности на FGF19 за да поставим диагноза МЖК. Тези патофизиологични механизми, може да са ко-фактор допринасящ за тежестта на диарията при пациентите с IBD. Изследвахме корелацията като изключихме ФКП от статистическите уравнения и отново открихме корелация на FGF19 със стойностите на stool index и броя на изхожданията дневно, като това допълнително допринася да заключим, че МЖК е ко-фактор в диарията при пациентите с ХВЗЧ в активност. Според някои автори, увеличената концентрация на жлъчни киселини в дебелото черво повлиява мотилитета на колона, колонното транзитно време и най-вече влияе върху Cl⁻ канали, които са основен механизъм за контрол на диарията [133][134]. Това утвърждава FGF-19 като един полезен индиректен маркер не само за скрининг за МЖК, но и средство за обективно определяне степента и тежестта на хроничната диария.

Извлечен от еозинофили невротоксин/Еозинофилен протеин x (EDN/EPX)

В патогенезата на ХВЗЧ (Улцерозен колит и Болест на Крон), възпалителния процес обхваща много възпалителни клетки, като еозинофилите играят все по-важна роля като про-инфламаторни и про-мотилитетни агенти, въпреки техния нисък процент в периферната кръв и мукозата. В нашето проучване проведохме изследване на фекалния извлечен от еозинофили невротоксин/Еозинофилен протеин x (EDN/EPX) и доказахме неговата роля в чревното възпаление при пациенти с ХВЗЧ,

като го сравнихме със съществуващия биомаркер за чревно възпаление - ФКП, който е патофизиологично свързан с неутрофилите. Проблемът идва в това, че много различни „органични“ заболявания, имат възпаление различно по механизъм от неутрофилната чревна инфилтрация, което може да доведе объркване при тези пациенти с хронична диария ако бъдат скринирани само с ФКП. Това налага търсенето на допълнителни биомаркери, които да помогнат в скринирането на пациенти с хронична диария за насочване за колоноскопия с биопсия за отхвърляне на органично заболяване. В нашето проучване при пациенти с ХВЗЧ в активност (релапс) открихме статистически значима разлика между средните стойности на EDN/EPX спрямо пациентите с IBS-D и здравите контроли ($p < 0.001$), което говори за добра диагностична точност и специфичност на EDN/EPX за разграничаване на органично от функционално заболяване. При всички изследвани болни, нивата на EDN/EPX кореспондират с тежестта на възпалителния процес и корелират позитивно с нивата на ФКП, независимо от резултатите на FGF-19.

За да определим диагностичната точност на EDN/EPX, приехме прагова стойност (cut-off) от 366 ng/mL. и получихме AUC крива 0.855, като над тази крива определяме налично чревно възпаление при пациенти с active IBD (релапс на заболяването) и получаваме чувствителност от 80%, специфичност от 90.9%, NPV 62.5% и много висока PPV от 96% в сравнение с ФКП, който при (50 μ g/g cut-off) е с чувствителност 78% и специфичност от 72.7% при пациенти с активно IBD. EDN/EPX показва много по-висока специфичност и позитивна предсказваща способност при пациенти с активно IBD, поради което може да се предположи неговото бъдещо използване като маркер за мониториране на чревното възпаление при IBD пациенти. При анализа за двата сурогатни маркера за откриване на чревно възпаление при всички групи пациенти с хронична диария спрямо здравите контроли и при използване на cut-off стойности на ФКП

от 100 $\mu\text{g/g}$, получихме чувствителност и специфичност от 96.67% и 62.22 % за ФКП, докато EDN/EPX при същия cut-off показва чувствителност от 80.00% и специфичност от 61.11%. От това можем да заключим че EDN/EPX има висока специфичност и PPV при IBD active, но има ниска чувствителност за чревно възпаление при другите възпалителни заболявания в червата. Тези специфични свойства на EDN/EPX да показва чревно възпаление специфично *само* за IBD са проучени и от колектива на Zhiyan Li [104], където те откриват потенциалната роля на еозинофилните биомаркери в проследяването на IBD пациентите [135].

При изследването на оперираните болни установихме, че пациентите с БК в ремисия след илеална резекция (IR-CD) $n=8$ имат значимо по-високи средни стойности на ФКП ($140.55 \pm 95 \mu\text{g/g}$), в сравнение със здравите контроли ($p = 0.004$) и също спрямо цялата група IBD в ремисия без операция от $n=21$ ФКП ($81,33 \mu\text{g/g}$) ($p = 0.023$). Този феномен говори, че оперираните болни с IBD в ендоскопска ремисия (Rutgeerts score ≤ 1) имат леко завишен ФКП и налично неутрофилно възпаление, което корелира с данните от предходните изследвания на дисертационния труд на д-р Р. Наков [7].

При сравнение на средните стойности на EDN/EPX при IR-CD в ендоскопска *ремисия след операция* $n=8$ (288 ng/mL.) спрямо IBD групата *ремисия без операция* $n=21$ (412.152 ng/mL.), не установихме сигнификантна разлика между двете групи ($p = 0.526$), което показва, че EDN/EPX може да се окаже по-специфичен маркер за чревно възпаление при резецирани IBD пациенти от ФКП (използвахме ендоскопията като референтен метод). Допълнителен факт е, че средните (mean) стойности на EDN/EPX имат малко стандартно отклонение (SD) при здравите доброволци, което е белег за малка вариабилност и по-висока специфичност на маркера, което потенциално би му определило място при пациентите с IBD след резекция. Нашата кохорта е от много малко

пациенти и са необходими по-големи проспективни проучвания, за да може се изясни ролята на EDN/EPX в проследяването на чревното възпаление при оперирани IBD болни.

При ROC-анализа на едновременното комбинирано измерване на тези ФКП и EDN/EPX установихме зона под кривата (AUC) от 0.997 и чувствителност от 80.00% и много висока специфичност 99.1%, за откриване на чревно възпаление при пациенти с хронична диария спрямо здрави контроли ($p < 0.001$). Следователно, ако един от двата маркера е увеличен над горна граница при даден пациент, шансът изследвания пациент с хронична диария да има органично заболяване е 85%. Това показва, че комбинирането на двата маркера при всеки пациент с хронична диария, ще ни донесе много висока специфичност която дава възможност да открием IBD или MC и да насочим пациента за ендоскопия с биопсия.

Сравнителен анализ между различните биомаркери

Установихме много силна позитивна корелация между стойностите на EDN/EPX и стойностите на клиничните индекси за болестна оценка CDAI при всички пациенти с БК (активност и ремисия) ($r=0.680$, $p < 0.001$). Наблюдавахме и силна позитивна корелация на EDN/EPX с ендоскопския Мейо скор (EMS) при всички пациенти с УК (активност и ремисия) ($r=0.700$, $p < 0.001$), и с Mayo Score (full) за оценка на болестна активност при УК ($r=0.855$, $p < 0.001$). От проведения анализ установихме сигнификантна позитивна корелационна зависимост във всички групи пациенти между EDN/EPX и нивата на ФКП ($r=0.601$, $p < 0.001$). Сравнението показва, че EDN/EPX може да бъде приложен в ежедневната практика за градиране на възпалителната активност на пациенти с IBD.

При анализа намираме, че липсва потенциална асоциация между нивата на ФКП и стойностите на FGF-19 при всички групи пациенти ($p = 0.058$), както и липсва корелация между двата маркера ($r=-0.173$, $p = 0.058$),

което индиректно показва, че МЖК може би *няма отношение към чревното възпаление* и е самостоятелен фактор за диарията при пациенти с IBD. Фекалните жлъчни киселини (ТФФА) не показаха сигнификантна разлика между различните групи и не показаха асоциация или зависимост между различните други изследвани биомаркери.

Констатирахме, че стойностите на FGF-19 при всички групи пациенти с хронична диария показват силна отрицателна корелация с клиничните показатели за тежест на диарията stool index и брой изхождания/дневно ($r = -0.800$, $p < 0.001$). Това предполага, че FGF-19 е един обективен маркер за оценка на тежестта на хроничната диария, особено при пациенти с МК и IBD. Патогенезата на диарията се влияе от много фактори, но един от тях е концентрацията на ЖК в дебелото черво и според последните данни, се смята, че ЖК играят важен регулаторен механизъм за осмоларитета и моториката на червата при хроничната диария [66][134].

При всички пациенти с IBS-D, които *съобщават* за висок брой изхождания и $BSS > 6$, FGF-19 би могъл да покаже дали *обективно* имат такава тежка диария, предвид ролята на ЖК в патогенезата на диарията, защото FGF-19 кореспондира добре с клиничните индекси за хронична диария. Между 57% и 87% от IBS пациентите изследвани в едно проучване имат реално установена характеристика на диарични изхождания [83]. Тази теория се подкрепя от наскоро публикувания мета-анализ на Valentin и сътрудници от Mayo Clinic [74], които потвърждават ролята на биомаркерите за МЖК, като средство за скриниране на пациенти с хронична водниста диария и тяхната добра ефективност.

ХВЗЧ в ремисия и необяснима хронична диария

От друга страна, не по-малко важен аспект е налична хронична водниста диария при ендоскопска и биохимична ремисия при IBD. В

нашето проучване съобщеният от пациентите среден брой изхождания в групата IBD в ремисия е 5.86/дневно, на фона средни стойности на ФКП 81 $\mu\text{g/g}$, като $n=17/21$ (81%) от пациентите съобщават за повече от >3 изхождания дневно. При тази група стойностите на медианата на FGF-19 е 0.009 pg/mL . (0.005- 78.142). $\text{FGF19} \leq 114,07 \text{ pg/mL}$. се открива при 76% от пациентите, което кореспондира с това, че МЖК е важен ко-фактор в патогенезата на диарията при пациентите в ендоскопска и биохимична ремисия с над 3 изхождания дневно ($p < 0.001$). При суб-анализа само на БК, без резекция и в ендоскопска ремисия (NR-CD) откриваме $n=9$ пациента, като $n=7/9$ (76%) установихме средни стойности (mean) на FGF-19 от $113.00 \pm 85.55 \text{ pg/mL}$., и $\text{FGF19} \leq 114,07 \text{ pg/mL}$ което е със сигнификантна разлика спрямо здрави контроли ($p < 0.001$). От това може да се направи извод, че при БК в ремисия при голям процент от пациентите има МЖК - ко-фактор на тяхното състояние, а FGF-19 би могъл да се използва като маркер за диагностициране на това състояние.

Обичайният подход при пациенти с ХВЗЧ, които са били в ремисия и започнат отново да имат над 3 изхождания дневно е да се приеме, че те са релапсирали и да се увеличи дозата на лекарствата контролиращи чревното възпаление. Вместо това е по-добре да се изследват фекалните и серумните маркери, за да се ориентираме за друга (невъзпалителна) подлежаща причина за увеличени брой изхождания. Този феномен е проучен в едни систематичен обзор разглеждащ БК в ремисия без операция (изследван е отговора към холестирамин) чрез провеждане на SeHCAT. Авторите са установили в 3 проучвания, че приемането на хелатори на жлъчните киселини има значителен “cost-effective” ефект за дългосрочното лечение и контрол на заболяването БК [68].

ХВЗЧ след хирургични интервенции (илеална резекция или IPAA)

В настоящото проучване извършихме оценка на оперираните болни с ХВЗЧ и наличието на хронична диария дължаща се на малабсорбция на

жлъчни киселини. МЖК е чест проблем при пациенти с БК и много малко са данните в литературата за не-инвазивни тестове за МЖК при тези пациенти [59][64]. При тези пациенти с резекция на терминалния илеум и БК е доказано че приемът на холестирамин е ефективен- той значително намалява броя на изхожданията и оплакванията на пациента [59][64].

Средният брой на изхождания на нашите пациентите в групата n=21 IBD след хирургична интервенция (IR-CD и IPAA) е 9.00 изхождания/дневно, на фона средни стойности на ФКП 375 $\mu\text{g/g}$. При избрана значително по-ниска прагова стойност (cut-off) за FGF19 от $\leq 32.88 \text{ pg/mL}$. в тази група пациенти, открихме AUROC 0.93 с чувствителност от 90.5%, специфичност от 81.8%, PPV 90.48% и NPV 81.82% за диария дължаща се на МЖК при IBD след резекция на илеума или илеоанална J-rouch анастомоза ($p < 0.001$). Въпреки, че използвахме най-ниските прагови стойности на FGF-19, при оперираните болни открихме *най-ниските средни стойности* на FGF19 и същевременно най-високата диагностична точност на серумния FGF19, като диагностицирахме МЖК при 90% от пациентите с IR-CD и IPAA. Нашите данни напълно кореспондират с докладваните резултати на Borhede и сътрудници през 2011 [114], които използват SeHCAT и установяват, че 90% от пациентите с илеална резекция на БК имат МЖК, като дори препоръчват при всички пациенти с тънкочревно засягане на БК (независимо от стойностите на ФКП) да се има предвид подлежаща МЖК и да се започне лечение с хелатори [114].

При суб-анализа на пациентите с БК с резекция в ремисия n=8 (IR-CD remission), установихме n=7/8 от пациентите с FGF19 $\leq 114,07 \text{ pg/mL}$., което говори отново за висока степен на МЖК при пациентите в групата с БК с резекция на илеума в ремисия и с клинични данни хронична диария.

При болните с резекция на терминалния илеум по повод БК n=9, и с ендоскопски рецидив (Rutgeerts score $\geq i2$ и биохимична активност според

ФКП и EDN/EPX) установихме, че при $n=9/9$ $FGF19 \leq 136,07$ pg/mL. и средните стойности на FGF19 в групата са 12.145 ± 112.11 pg/mL. Това са сигнификантно най-ниските получени резултати спрямо здравите контроли и останалите групи ($p < 0.001$). При пациентите с УК оперирани с IPAA $n=4$ и ендоскопски доказан паучит, установихме, че всички $n=4/4$ пациенти имат стойности на $FGF19 \leq 98.01$ pg/mL., като средните стойности са 24.58 ± 20 pg/mL., с данни за тежка МЖК, което потвърждава нашата хипотеза за патогенетичната роля на ЖК при IPAA и паучит. При провеждането на корелационен анализ между стойностите на FGF-19 и тежестта на диарията при IPAA (определен чрез брой изхождания дневно и SI), намерихме умерена отрицателна корелация, която е сигнификантна ($r=-0.544$, $p = 0.011$; $r=-0.593$, $p = 0.005$).

При оперираните IBD болни, в различни други проучвания е установено, че няма корелация между размера на резекцията на червото и степента на МЖК. Дори резекции по-малки от <10 см. на терминалния илеум, също водят до развитие на МЖК [59][64][114]. Вземайки предвид получените от нас данни и изхождайки от теорията за „proof of concept”, че почти всички оперирани IBD (които са със сигурна МЖК (SeHCAT в други проучвания [80]), и бихме могли да приемем, че FGF-19 е индиректен маркер за МЖК при оперирани IBD - от това следва, че ако открием ниски стойности на FGF-19 при други пациенти с хронична диария, хипотетично можем да твърдим, че е налична МЖК независимо от състоянието.

При сравнение на средните стойности на EDN/EPX при IR-CD в ендоскопска ремисия след операция $n=8$ (288 ng/mL.) спрямо цялата IBD remission без операция $n=21$ (412.152 ng/mL.) не установяваме сигнификантна разлика между двете групи ($p = 0.526$), което показва, че EDN/EPX може да се окаже по-специфичен маркер за чревно възпаление при резецирани IBD пациенти спрямо ФКП ако използваме ендоскопията като референтен метод. Нашата кохорта е от много малко пациенти и по-

големи проспективни проучвания са нужни, за да може се определи ролята на EDN/EPX в проследяването на чревното възпаление при оперирани IBD болни.

Ограниченията (limitations) в нашето проучване са малката кохорта пациенти, относително малкия брой пациенти в различните подгрупи и малкият брой здрави доброволци. Въпреки, че много автори смятат, че няма златен стандарт в тестовете за МЖК, друго ограничение в нашето проучване в България е, че нямаме наличен SeHCAT (като най-стария използван метод за оценка МЖК). Честотата на микроскопския колит сред нашата кохорта може да не е репрезентативен за България, защото заболяването е активно търсено и пациенти са насочвани към нашия център. Негативните резултати от фекалните жлъчни киселини може да се дължат на факта, че са извършвани от еднократна проба фецес и сме използвали ELISA метод (по-малко ефективен), вместо HPLC за тяхното определяне.

Настоящото проучване беше проведено с цел изграждане на единен диагностичен алгоритъм за оценка на пациенти с хронична диария, за диагностициране на пациенти с микроскопски колит и установяване на неинвазивни сурогатни маркери за малабсорбция на жлъчни киселини независимо от маркерите на чревно възпаление. Получените от нас резултати дефинират нуждата от приложението на серумния *FGF-19* в рутинната практика за диагностициране на МЖК *при всички пациентите с хронична диария*, както и използването на извлечения от еозинифили невротоксин (*EDN/EPX*) *за проследяване на чревното възпаление при IBD болни*, особено при мониторирането в хода на болестта, в комбинация с ФКП за един цялостен завършен диагностичен процес.

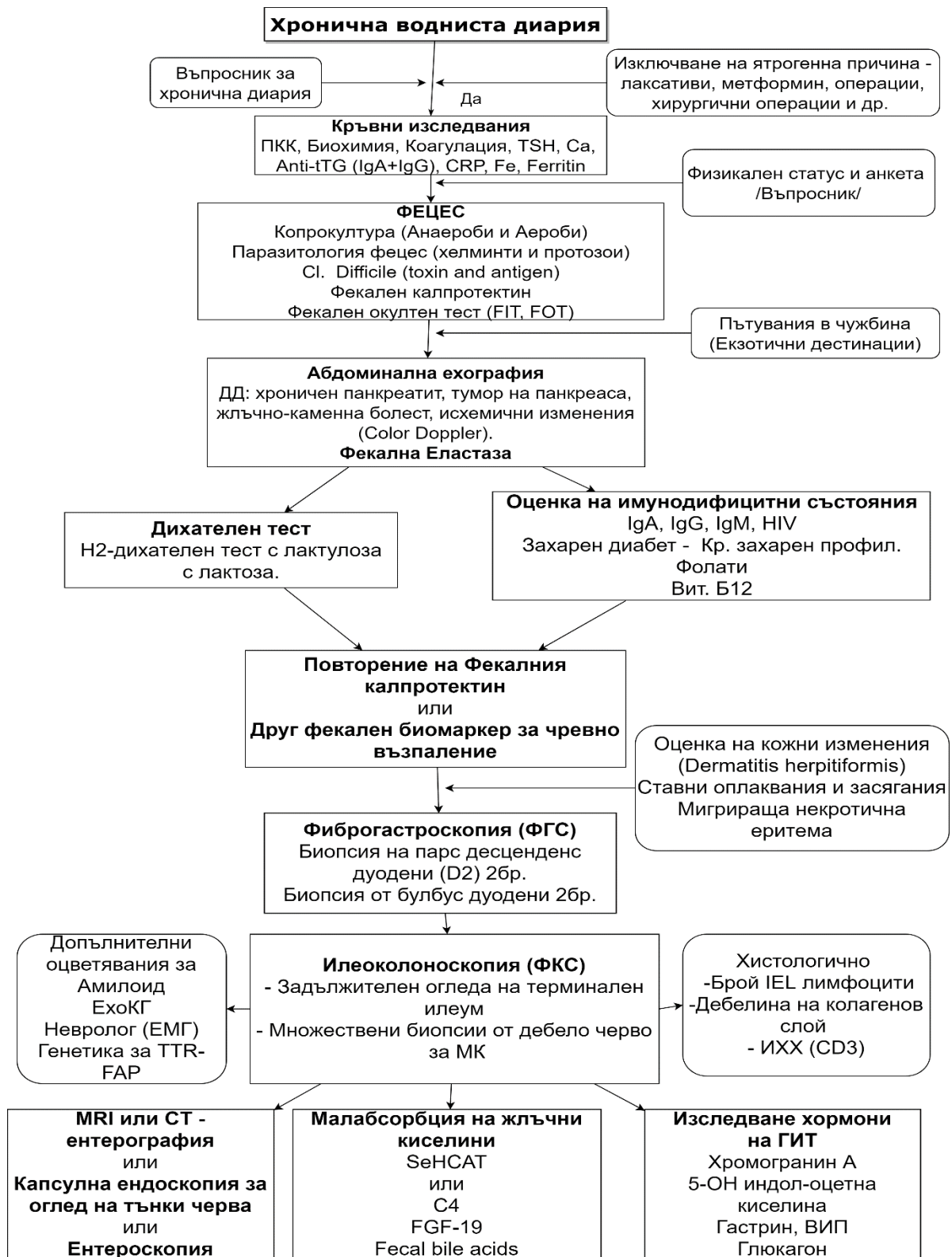
9. ИЗВОДИ

1. Използваните текущи анкетни методи за докладване на формата на изхожданията и честотата на изхожданията не са ефективни за определяне тежестта на хроничната диария. Изследването на серумния FGF-19 е потенциален биомаркер за обективно определяне тежестта на диарията при пациенти с IBD и МК.
2. Микроскопски колит с честота 12.8% от всички изследвани пациенти се открива чрез множествените биопсии от дебелото черво при пациенти с хронична водниста диария, прием на НСПВС, ИПП и завишени стойности на ФКП.
3. Серумният FGF-19 има висока диагностичната стойност и потенциално клинично приложение като не-инвазивен биомаркер за определяне на малабсорбция на жлъчни киселини (МЖК) при пациенти с МК и IBD.
4. Фекалният извлечен от еозинофили невротоксин (EDN/EPX) показва висока специфичност и PPV за откриване на възпалителна активност при IBD и предсказване на релапс. Комбинация на ФКП и EDN/EPX има много висока специфичност за откриване на чревно възпаление.
5. Сравнителният анализ показва, че FGF-19 отразява степента на МЖК при пациенти с хронична диария независимо от чревното възпаление и не корелира с EDN/EPX и ФКП.
6. Пациентите с IBD в ендоскопска и биохимична ремисия с необяснима хронична диария би трябвало да се изследват за подлежаща МЖК.
7. Всички пациенти с IBD след хирургични интервенции (резекция на илеума или IPAA) са с най-ниски серумни нива на FGF-19, следователно имат най-тежка степен на МЖК.

10. ПРИНОСИ

1. Извършена е комплексна оценка на пациентите с хронична водниста диария и е предложен диагностичен алгоритъм със стъпаловидна стратегия за поставяне на диагнозата. *Принос с клинично-приложен характер.*
2. Внедрен е протокол за множествени биопсии при пациенти с хронична диария за доказване на микроскопски колит. Демонстриран е ефектът от екзактното диагностициране, извършено от патологоанатома. *Принос с практичен характер.*
3. Представена е клиничната значимост и диагностичната точност на серумния FGF-19 като не-инвазивен биомаркер за диагностициране на МЖК. *Принос с научно-приложен характер.*
4. Обективизирана е ролята на EDN/EPX като специфичен маркер за чревно възпаление при пациенти с IBD. *Принос с научен характер.*
5. Определено е мястото на EDN/EPX за разграничаване на органично от функционално заболяване при комбинирано изследване с ФКП. *Принос с научнопрактичен характер.*
6. Доказана е ролята на МЖК за патогенезата на невъзпалителна причина за диарията при пациенти с хронична диария и IBD в ендоскопска ремисия. *Принос със научен характер.*
7. Разработен е системен алгоритъм при пациенти с IBD след хирургични интервенции за изясняване на произхода на хроничната диария. *Принос с клинично-приложен характер.*

11. СТРАТЕГИЯ И ПОДХОД ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНА ВОДНИСТА ДИАРИЯ



Фигура 30. Диагностичен алгоритъм и подход при пациенти с хронична водниста диария

12. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

12.1 Публикации във връзка с дисертацията

1. **Lyutakov I.**, Nakov R., Vladimirov B., Nakov V., Dimov A., Asenova B., Chetirska M., Vatcheva- Dobrevska R., Kyoseva D., Terzieva N., Penchev P. Diagnostic accuracy and predictive value of serum fibroblast growth factor 19 (FGF19) and total free fecal bile acids as biomarkers of bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhea: A pilot study. C. R. Acad. Bulg. Sci. (Under E-printing) – под печат в списание „доклади на БАН“ – 2018г. (Протокол №9/30.10.2018г.) (IF - 0.270)
2. **Lyutakov I.A.**, Penchev P., Kyoseva D. Diagnostic algorithm and treatment for microscopic colitis: A Review. Int. J. Adv. Res. 5(10), 616-629.
3. **Лютаков И.**, Пенчев П., Владимирова Б. Диагностична оценка на малабсорбцията на жлъчни киселини при пациенти с микроскопски колит и хронична диария. Българска хепатогастроентерология, Бр. 1, 2019г. 55-65

12.2 Международни участия на конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията

1. **Lyutakov I.**, The role of bile acids biomarkers in the algorithm in chronic diarrhea. Basic Science Course 2018 Leuven, Belgium. (Abstract accepted)
2. **Lyutakov I.**, Penchev P., Nakov R., Asenova B., Chetirska M., Vatcheva-Dobrevska R., Vladimirov B. Evaluation of serum fibroblast growth factor 19 (FGF19) and total free fecal bile acid in stool as markers of bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhea: a pilot study. Symposium 211, XXV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018, July 6 – 7, Dublin, Ireland. (poster presentation)
3. **Lyutakov I.**, Penchev P., Terziev I., Vladimirov B. Do we need so many tests for patients with chronic diarrhea? Case report. 2018 Salzburg Columbia Seminar in Internal Medicine. 26 August - 1 September 2018, Salzburg, Austria. (oral presentation)
4. **Lyutakov I.**, Nakov R., Vladimirov B., Nakov V., Dimov A., Asenova B., Chetirska M., Vatcheva- Dobrevska R., Kyoseva D., Terzieva N., Penchev P. P149 Searching for bile acid malabsorption using serum fibroblast growth factor 19 (FGF19) and faecal bile acids in patients with inflammatory bowel diseases, microscopic colitis and irritable bowel syndrome. Hard-copy poster at 14th Congress of ECCO, March 6-9, 2019 (poster presentation)

5. **Lyutakov I.**, Nakov R., Vladimirov B., Nakov V., Dimov A., Asenova B., Chetirska M., Vatcheva- Dobrevska R., Kyoseva D., Terzieva N., Penchev P. P268 Eosinophil-derived neurotoxin (eosinophil protein x) showed higher specificity and positive predictive value for detecting disease activity in inflammatory bowel disease compare to faecal calprotectin. Presented Hard-copy poster at 14th Congress of ECCO, March 6-9, 2019 (poster presentation)
6. **Lyutakov I.**, Nakov R., Vladimirov B., Nakov V., Dimov A., Asenova B., Chetirska M., Vatcheva- Dobrevska R., Kyoseva D., Terzieva N., Penchev P. Diagnostic accuracy of serum fibroblast growth factor 19(FGF19) and total free faecal bile acids as biomarkers of bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhea: A pilot study. *Oral presentation and One of the top 10 best abstract* at 1st European Conference for Young Gastroenterologist (ECYG) from 6-9 December 2018 in Zagreb, Croatia (oral presentation)
7. **Ivan Lyutakov.** Y-ECCO News. Literature Review. e-Library (https://www.ecco-ibd.eu/publications/ecco-news/lit-reviews/item/y-ecco-literature-review-ivan-lyutakov.html?category_id=546). Serum Concentration of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one Are Associated With Bile Acid Diarrhea in Patients With Crohn's Disease April 2019. (E-Literature Review).

12.3 Национални конгреси и участия във връзка с дисертацията

1. **Лютаков И.**, Пенчев П., Наков Р., Наков В., Асенова Б, Четирска М., Димов А., Терзиева Н., Къосева Д., Вачева Р., Владимирова Б. Чувствителност и специфичност на серумен фибробластен растежен фактор 19 (FGF19) и общи свободни фекални жлъчни киселини като биомаркери за откриване на малабсорбция на жлъчни киселини при пациенти с хронична диария: Пилотно проучване. XIII-тият конгрес на БДГЕ ще се проведе на 11 – 13 октомври 2018 г. в гр. София, РАМАДА София, Сити Център. (Постер)
2. **Лютаков И.**, Наков Р., Вълков Х., Терзиев И., Терзиева Н., Къосева Д., Пенчев П., Владимирова Б. Размерът има ли значение в Гастроентерологията: Макроскопски срещу Микроскопски? Конгрес на младите гастроентеролози 2019. Медицински Университет София, София , България 2019. (орална презентация)
3. **Лютаков И.**, Наков Р., Вълков Х., Терзиев И., Терзиева Н., Къосева Д., Пенчев П., Владимирова Б. Едно подценявано заболяване: Микроскопски колит. Национален конгрес по Патология, Велинград, България 2019 (орална презентация)

13. ОДОБРЕНИ НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Тема Ръководител/член на колектив	Финансираща организация	№ на Договора Година на стартиране
Доц. Пламен Иванов Пенчев, дм	Медицински Университет София	ДОГОВОР № Д- 119/02.05.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 8510/12.12.2016 г.
Д-р Иван Александров Лютаков	Медицински Университет София	„Млад Изследовател 2017“ ДОГОВОР № Д – 136 /02.05. 2017 г., ПРОЕКТ вх. № 8487/09.12.2016 г.
Доц. Пламен Иванов Пенчев, дм	Медицински Университет София	Договор № Д 108 /23.04.2019 за финансиране на научни изследвания по конкурс „Грант 2019“ с ПРОЕКТ с вх. № 8294/21.11.2018

14. БЪДЕЩИ ПРОЕКТИ И НАУЧНИ РАЗРАБОТКИ

1. Да се направи сравнение между FGF19 и серумния C4 (HPLC)
2. Да внедрим рутинното изследване на FGF-19 в лабораторията по микробиология и вирусология към УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД.
3. Да изследваме всички холецистектомирани с диария (FGF-19 и C4)
4. Да въведем всички диагностицирани с МК в електронен регистър и да търсим нови биомаркери за тези болни.
5. Да внедрим рутинното приложение на хелаторите на жлъчните киселини при доказна МЖК.
6. Да търсим колонна FXR експресия при пациенти с хронична диария.
7. Да проведем проспективно проучване на пациентите лекувани с холестирамин и изследване на стойностите на C4 и FGF19 след лечение.
8. Терапия с алуминиум хидрооксид на пациенти с МЖК.
9. Да изследваме ролята на EDN/EPX при пациенти с инфекциозна (паразитологична) генеза на диарията срещу IBD пациентите

15. ПРИЗНАТЕЛНОСТ

Благодарни сме на:

Доц. Р. Вачева-Добревска, Д-р Б. Асенова и М. Четирска от Лаборатория по микробиология и вирусология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ за изработването на серумните и фекалните биомаркери за FGF-19, TFFBA и EDN/EPX (ELISA).

Д-р Радислав Наков и Доц. В. Наков от Клиника по Гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, за изработването на фекалния калпротектин.

Д-р И. Терзиев от Отделението по Патология на УМБАЛ „Царица Йоанна - ИСУЛ“ за поставянето на хистологична диагнозата МК сред пациенти с хронична диария

Д-р Кьосева и Д-р Терзиева от Катедрата по Патоанатомия на УМБАЛ „Александровска“ за помощта в поставянето на диагнозата МК и стадиране на процеса.

Съвета по медицинска наука към Медицински Университет София за полученото финансиране по програма Млад Изследовател 2017, Грант 2017 и Грант 2019.

„Мъдрият човек извлича от своите грешки не по-малко знания, отколкото от своите успехи.“ - Джон Дюи

16. БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] Х. Кадиян and А. Михова, “Колагенов колит,” *Военна медицина*, vol. 1, no. 1, pp. 40–41, 1992.
- [2] С. Стойнов, В. Герова, Н. Цолова, Г. Савов, В. Ценов, and П. Пенчев, “Проучване на субепителния колагенов слой и имуноглобулин секретиралите клетки в лигавицата на тънкото черво при някои чревни заболявания,” *Из опыта на здравните заведения*, vol. XXVIII, no. 4, pp. 3–7, 1997.
- [3] В. Герова, Р. Еникова, С. Стойнов, and и сътр, “Паралелни микробиологични, клинично-морфологични и ензимни проучвания при болни с хроничен неспецифичен ентерит и глутенова ентеропатия,” *Съвр. мед.*, vol. XLII, no. 3, pp. 64–67, 1991.
- [4] С. Стойнов, “Тънко черво - патогенетични механизми, клинично протичане, диагноза и лечение [Дисертация],” *Медицински университет София*, vol. Дисертацио, pp. 9–35, 2007.
- [5] Л. Танкова, А. Александрова, П. Пенчев, Х. Кадиян, В. Драганов, and Д. Недин, “Трансабдоминална и ендолуменна ехография при улцерозен колит,” *Съвременна медицина*, vol. 53, no. 2, pp. 3–8, 2002.
- [6] В. Наков, “Фекален калпротектин - неинвазивен маркер за оценка на чревното възпаление [Дисертация].,” *Медицински университет София*, vol. София, 2011.
- [7] Р. Наков, “Оптимална стратегия за проследяване на пациенти с възпалителни чревни заболявания [Дисертация],” *Медицински университет София*, vol. София, 2017.
- [8] С. Стойнов, “Синдром на малабсорбция,” *Гастроентерология*, vol. Ред.: З. К, no. Тилия, София, pp. 99 – 107, 1997.
- [9] П. Пенчев, “Клинична характеристика, протичане и лечение на болестта на Крон – някои специфични особености наблюдавани в 18

- годишния ни опит. [Дисертация],” *Медицински университет – София*, no. София, 2009.
- [10] М. Мирчев, И. Коцев, Ф. Кал, and Р. Бютнер, “Фамилен колоректален рак – генетични и епигенетични характеристики,” *Българска хепатогастроентерология*, vol. 1, pp. 46–53, 2010.
- [11] А. Атанасова, “Хронични възпалителни заболявания на червата-поглед от XXI век (съвременни аспекти),” *ИК “Стено,”* no. Варна, 2015.
- [12] L. R. Schiller, D. S. Pardi, and J. H. Sellin, “Chronic Diarrhea: Diagnosis and Management,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2016.
- [13] P.-O. Stotzer *et al.*, “Are the definitions for chronic diarrhoea adequate? Evaluation of two different definitions in patients with chronic diarrhoea.,” *United Eur. Gastroenterol. J.*, vol. 3, no. 4, pp. 381–6, Aug. 2015.
- [14] R. P. Arasaradnam *et al.*, “Guidelines for the investigation of chronic diarrhoea in adults: British Society of Gastroenterology, 3rd edition,” *Gut*, vol. 67, no. 8, pp. 1380–1399, Aug. 2018.
- [15] M. Camilleri, J. H. Sellin, and K. E. Barrett, “Pathophysiology, Evaluation, and Management of Chronic Watery Diarrhea,” *Gastroenterology*, 2016.
- [16] R. J. Saad *et al.*, “Do Stool Form and Frequency Correlate With Whole-Gut and Colonic Transit? Results From a Multicenter Study in Constipated Individuals and Healthy Controls,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 105, no. 2, pp. 403–411, Feb. 2010.
- [17] M. H. Mosli *et al.*, “C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 110, no. 6, pp. 802–819, Jun. 2015.
- [18] C. Langner *et al.*, “Histology of microscopic colitis-review with a practical approach for pathologists,” *Histopathology*, vol. 66, no. 5, pp. 613–626,

Apr. 2015.

- [19] R. Chetty and D. Govender, “Lymphocytic and collagenous colitis: an overview of so-called microscopic colitis.,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 9, no. 4, pp. 209–18, Feb. 2012.
- [20] D. Guagnozzi and A. J. Lucendo, “Advances in knowledge on microscopic colitis: From bench to bedside.,” *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, vol. 107, no. 2, pp. 98–108, Feb. 2015.
- [21] V. Villanacci, S. Manenti, E. Antonelli, M. Chiudinelli, V. Giuliano, and G. Bassotti, “Non-IBD colitides: Clinically useful histopathological clues,” *Rev. Esp. Enfermedades Dig.*, vol. 103, no. 7, pp. 366–372, 2011.
- [22] A. Sonnenberg and R. M. Genta, “Geographic distributions of microscopic colitis and inflammatory bowel disease in the United States,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 18, no. 12, pp. 2288–2293, Dec. 2012.
- [23] F. Magro *et al.*, “European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 7, no. 10, pp. 827–851, 2013.
- [24] D. Guagnozzi, S. Landolfi, and M. Vicario, “Towards a new paradigm of microscopic colitis: Incomplete and variant forms,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 38, p. 8459, Oct. 2016.
- [25] A. Münch *et al.*, “Microscopic colitis: Current status, present and future challenges,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 6, no. 9, pp. 932–945, Oct. 2012.
- [26] M. A. Storr, “Microscopic Colitis: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Current Management—An Update 2013,” *ISRN Gastroenterol.*, vol. 2013, pp. 1–12, 2013.
- [27] O. H. O’Mahony, M. Burgoyne, and J. J. Going, “Specific histological abnormalities are more likely in biopsies of endoscopically normal large bowel after the age of 60 years,” *Histopathology*, vol. 61, no. 6, pp. 1209–1213, Dec. 2012.
- [28] F. Fernández-Bañares *et al.*, “Current concepts on microscopic colitis:

- evidence-based statements and recommendations of the Spanish Microscopic Colitis Group,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 43, no. 3, pp. 400–426, Feb. 2016.
- [29] M. A. Rasmussen and L. K. Munck, “Systematic review: are lymphocytic colitis and collagenous colitis two subtypes of the same disease - microscopic colitis?,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 36, no. 2, pp. 79–90, Jul. 2012.
- [30] O. K. Bonderup, T. Wigh, G. L. Nielsen, L. Pedersen, and M. Fenger-Grøn, “The epidemiology of microscopic colitis: a 10-year pathology-based nationwide Danish cohort study,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 50, no. 4, pp. 393–398, Apr. 2015.
- [31] N. M. Gentile *et al.*, “The epidemiology of microscopic colitis in Olmsted County from 2002 to 2010: a population-based study,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 5, pp. 838–42, May 2014.
- [32] D. Guagnozzi, A. J. Lucendo, T. Angueira-Lapeña, S. González-Castillo, and J. M. Tenias Burillo, “Prevalence and incidence of microscopic colitis in patients with diarrhoea of unknown aetiology in a region in central Spain,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 44, no. 5, pp. 384–388, May 2012.
- [33] F. Fernández-Bañares, Y. Zabana, M. Aceituno, L. Ruiz, A. Salas, and M. Esteve, “Prevalence and Natural History of Microscopic Colitis: A Population-Based Study With Long-term Clinical Follow-up in Terrassa, Spain,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 10, no. 7, pp. 805–811, Jul. 2016.
- [34] B. P. M. Verhaegh, M. J. Pierik, D. Goudkade, Y. S. M. T. Cuijpers, A. A. M. Masclee, and D. M. A. E. Jonkers, “Early Life Exposure, Lifestyle, and Comorbidity as Risk Factors for Microscopic Colitis,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 23, no. 6, pp. 1040–1046, Jun. 2017.
- [35] B. P. M. Verhaegh *et al.*, “Incidence of microscopic colitis in the Netherlands. A nationwide population-based study from 2000 to 2012,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 47, no. 1, pp. 30–36, Jan. 2015.

- [36] G. Macaigne *et al.*, “Microscopic Colitis or Functional Bowel Disease With Diarrhea: A French Prospective Multicenter Study,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 109, no. 9, pp. 1461–1470, Sep. 2014.
- [37] D. Guagnozzi, Verhaegh Bas, Lucendo Alfredo J, Bohr Johan, Lyutakov Ivan, Macaigne6 Gilles, Fernández-Bañares Fernando, “Incidence and prevalence of microscopic colitis: systematic review and meta-analysis.,” *UEW Week 2019. UEG Abstr.*, vol. A head of, no. Part of data from EMCG: European Guideline for MC., p. A-1084-0055-03455, 2019.
- [38] B. Roth, R. J. Gustafsson, B. Jeppsson, J. Manjer, and B. Ohlsson, “Smoking- and alcohol habits in relation to the clinical picture of women with microscopic colitis compared to controls,” *BMC Womens. Health*, vol. 14, no. 1, p. 16, Dec. 2014.
- [39] J. Rasmussen, P. J. H. Engel, S. Wildt, A.-M. K. Fiehn, and L. K. Munck, “The Temporal Evolution of Histological Abnormalities in Microscopic Colitis,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 10, no. 3, pp. 262–268, Mar. 2016.
- [40] A. Münch and C. Langner, “Microscopic Colitis: Clinical and Pathologic Perspectives,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 13, no. 2, pp. 228–236, Feb. 2015.
- [41] S. J. Bickston, “Endoscopic Evaluation of Microscopic Colitis.,” *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*, vol. 11, no. 4, pp. 262–4, Apr. 2015.
- [42] R. Okamoto, M. Negi, S. Tomii, Y. Eishi, and M. Watanabe, “Diagnosis and treatment of microscopic colitis.,” *Clin. J. Gastroenterol.*, vol. 9, no. 4, pp. 169–74, Aug. 2016.
- [43] R. Grassia, P. Capone, V. Villanacci, G. P. Tanzi, and F. Buffoli, “Endoscopic features of microscopic colitis: The ‘grid-like’ pattern detected with HD+ colonoscopy plus i-scan.,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 49, no. 3, pp. 318–319, Mar. 2017.
- [44] G. Bouma and A. Münch, “Microscopic colitis.,” *Dig. Dis.*, vol. 33, no. 2, pp. 208–14, Apr. 2015.

- [45] A. Koulaouzidis, “Macroscopic findings in collagenous colitis: a multi-center, retrospective, observational cohort study,” *Ann. Gastroenterol.*, 2017.
- [46] W. Marlicz, K. Skonieczna-Żydecka, D. E. Yung, I. Loniewski, and A. Koulaouzidis, “Endoscopic findings and colonic perforation in microscopic colitis: A systematic review,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 49, no. 10, pp. 1073–1085, Oct. 2017.
- [47] A. Levy *et al.*, “Cancer risk in microscopic colitis: a retrospective cohort study,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 19, no. 1, p. 1, Dec. 2019.
- [48] A. O’Toole, “Optimal management of collagenous colitis: a review,” *Clin. Exp. Gastroenterol.*, vol. 9, p. 31, Feb. 2016.
- [49] G. C. Nguyen, W. E. Smalley, S. S. Vege, and A. Carrasco-Labra, “American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Medical Management of Microscopic Colitis,” *Gastroenterology*, vol. 150, no. 1, pp. 242–246, 2016.
- [50] T. De Corte *et al.*, “Beclomethasone dipropionate in microscopic colitis: Results of an exploratory open-label multicentre study (COLCO),” *United Eur. Gastroenterol. J.*, p. 205064061986096, Jul. 2019.
- [51] A. Baena García, F. Partida Palma, S. García Martínez, M. de Bonilla Candau, and M. Pajares Vinardell, “Gammagrafía con ^{75}Se -ácido tauroselcólico ($^{75}\text{SeHCAAT}^{\text{®}}$), ¿prueba de referencia en la malabsorción de ácidos biliares?,” *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol.*, Feb. 2019.
- [52] S. A. Slattery, O. Niaz, Q. Aziz, A. C. Ford, and A. D. Farmer, “Systematic review with meta-analysis: the prevalence of bile acid malabsorption in the irritable bowel syndrome with diarrhoea,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 42, no. 1, pp. 3–11, Jul. 2015.
- [53] I. Oduyebo and M. Camilleri, “Bile acid disease,” *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 33, no. 3, pp. 189–195, May 2017.
- [54] P. Vijayvargiya and M. Camilleri, “Update on Bile Acid Malabsorption:

- Finally Ready for Prime Time?,” *Curr. Gastroenterol. Rep.*, vol. 20, no. 3, p. 10, Mar. 2018.
- [55] M. Camilleri, “Bile Acid Diarrhea: Prevalence, Pathogenesis, and Therapy,” *Gut Liver*, vol. 9, no. 3, May 2015.
- [56] N. Mottacki, M. Simrén, and A. Bajor, “Review article: bile acid diarrhoea - pathogenesis, diagnosis and management,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 43, no. 8, pp. 884–898, Apr. 2016.
- [57] M. Camilleri, “Physiological underpinnings of irritable bowel syndrome: neurohormonal mechanisms,” *J. Physiol.*, vol. 592, no. 14, pp. 2967–2980, Jul. 2014.
- [58] L. Ruiz-Campos *et al.*, “Systematic review with meta-analysis: the prevalence of bile acid malabsorption and response to colestyramine in patients with chronic watery diarrhoea and previous cholecystectomy,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 3, pp. 242–250, Feb. 2019.
- [59] R. Battat *et al.*, “Serum Concentrations of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one are Associated with Bile Acid Diarrhea in Patients with Crohn’s Disease,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, Nov. 2018.
- [60] J. Torres *et al.*, “Farnesoid X Receptor Expression in Microscopic Colitis: A Potential Role in Disease Etiopathogenesis,” *GE - Port. J. Gastroenterol.*, vol. 25, no. 1, pp. 30–37, 2018.
- [61] V. S. Hegade *et al.*, “BAT117213: Ileal bile acid transporter (IBAT) inhibition as a treatment for pruritus in primary biliary cirrhosis: study protocol for a randomised controlled trial,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 16, no. 1, p. 71, Dec. 2016.
- [62] I. Koutsounas, S. Theocharis, I. Delladetsima, E. Patsouris, and C. Giaginis, “Farnesoid x receptor in human metabolism and disease: the interplay between gene polymorphisms, clinical phenotypes and disease susceptibility,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 11, no. 4, pp. 523–532, Apr. 2015.

- [63] S. Al-Dury and H.-U. Marschall, “Ileal Bile Acid Transporter Inhibition for the Treatment of Chronic Constipation, Cholestatic Pruritus, and NASH,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, Aug. 2018.
- [64] M. Lenicek *et al.*, “Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 6, pp. 1322–7, Jun. 2011.
- [65] P. Vavassori, A. Mencarelli, B. Renga, E. Distrutti, and S. Fiorucci, “The Bile Acid Receptor FXR Is a Modulator of Intestinal Innate Immunity,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 10, pp. 6251–6261, Nov. 2009.
- [66] P. Vijayvargiya and M. Camilleri, “Current Practice in the Diagnosis of Bile Acid Diarrhea,” *Gastroenterology*, vol. 156, no. 5, pp. 1233–1238, Apr. 2019.
- [67] O. Orekoya, J. McLaughlin, E. Leitao, W. Johns, S. Lal, and P. Paine, “Quantifying bile acid malabsorption helps predict response and tailor sequestrant therapy,” *Clin. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 252–7, Jun. 2015.
- [68] R. Riemsma *et al.*, “SeHCAT [tauroselcholic (selenium-75) acid] for the investigation of bile acid malabsorption and measurement of bile acid pool loss: a systematic review and cost-effectiveness analysis,” *Health Technol. Assess. (Rockv)*, vol. 17, no. 61, Dec. 2013.
- [69] National Institute for Health and Care Excellence (NICE), “DG7: sehcat (tauroselcholic [75 selenium] acid) for the investigation of diarrhoea due to bile acid malabsorption in people with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) or Crohn’s disease without ileal resection,” <https://www.nice.org.uk/Guid.dg7/Resour.sehcat-tauroselcholic-75-selenium-acid-for-the-Investig.of-diarrhoea-due-to-bile-acidmalabsorption-in-people-with-diarrhoeapredominant-Irrit.Syndr.ibsd-or-crohns->, 2012.
- [70] J. M. Turner, S. S. Pattni, R. N. Appleby, and J. R. Walters, “A positive SeHCAT test results in fewer subsequent investigations in patients with

- chronic diarrhoea,” *Frontline Gastroenterol.*, vol. 8, no. 4, pp. 279–283, Oct. 2017.
- [71] A. Koulaouzidis, “Distinct colonoscopy findings of microscopic colitis: Not so microscopic after all?,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 37, p. 4157, Oct. 2011.
- [72] S. S. Pattni, W. G. Brydon, T. Dew, and J. R. F. Walters, “Fibroblast Growth Factor 19 and 7 α -Hydroxy-4-Cholesten-3-one in the Diagnosis of Patients With Possible Bile Acid Diarrhea,” *Clin. Transl. Gastroenterol.*, vol. 3, no. 7, pp. e18–e18, Jul. 2012.
- [73] I. M. Johnston *et al.*, “Characterizing Factors Associated With Differences in FGF19 Blood Levels and Synthesis in Patients With Primary Bile Acid Diarrhea,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 111, no. 3, pp. 423–32, Mar. 2016.
- [74] N. Valentin *et al.*, “Biomarkers for bile acid diarrhoea in functional bowel disorder with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis,” *Gut*, vol. 65, no. 12, pp. 1951–1959, Dec. 2016.
- [75] C. Borup *et al.*, “Chenodeoxycholic acid stimulated fibroblast growth factor 19 response - a potential biochemical test for bile acid diarrhoea,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 45, no. 11, pp. 1433–1442, Jun. 2017.
- [76] J. D. Nolan, I. M. Johnston, S. S. Pattni, T. Dew, T. R. Orchard, and J. R. Walters, “Diarrhea in Crohn’s Disease: Investigating the Role of the Ileal Hormone Fibroblast Growth Factor 19,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 9, no. 2, pp. 125–131, Feb. 2015.
- [77] P. Vijayvargiya *et al.*, “Performance characteristics of serum C4 and FGF19 measurements to exclude the diagnosis of bile acid diarrhoea in IBS-diarrhoea and functional diarrhoea,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 46, no. 6, pp. 581–588, Sep. 2017.
- [78] P. Vijayvargiya, M. Camilleri, A. Shin, and A. Saenger, “Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 10, pp. 1232–1239, 2013.

- [79] J. R. F. Walters, I. M. Johnston, J. D. Nolan, C. Vassie, M. E. Pruzanski, and D. A. Shapiro, “The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid.,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 41, no. 1, pp. 54–64, Jan. 2015.
- [80] F. Gothe, F. Beigel, C. Rust, M. Hajji, S. Koletzko, and F. Freudenberg, “Bile acid malabsorption assessed by 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in pediatric inflammatory bowel disease: Correlation to clinical and laboratory findings,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 8, no. 9, pp. 1072–1078, 2014.
- [81] P. Vijayvargiya *et al.*, “Analysis of Fecal Primary Bile Acids Detects Increased Stool Weight and Colonic Transit in Patients With Chronic Functional Diarrhea,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 17, no. 5, pp. 922-929.e2, Apr. 2019.
- [82] A. Shin *et al.*, “Bowel Functions, Fecal Unconjugated Primary and Secondary Bile Acids, and Colonic Transit in Patients With Irritable Bowel Syndrome,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 10, pp. 1270-1275.e1, Oct. 2013.
- [83] P. Vijayvargiya, M. Camilleri, D. Burton, I. Busciglio, A. Lueke, and L. J. Donato, “Bile and fat excretion are biomarkers of clinically significant diarrhoea and constipation in irritable bowel syndrome,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 6, pp. 744–758, Mar. 2019.
- [84] M. Camilleri *et al.*, “Validating biomarkers of treatable mechanisms in irritable bowel syndrome,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 12, pp. 1677–1685, Dec. 2014.
- [85] C. Wilcox, J. Turner, and J. Green, “Systematic review: the management of chronic diarrhoea due to bile acid malabsorption.,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 39, no. 9, pp. 923–39, May 2014.
- [86] K. J. Lee, “Pharmacologic Agents for Chronic Diarrhea.,” *Intest. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 306–312, 2015.

- [87] R. K. Yantiss, “Eosinophils in the GI tract: how many is too many and what do they mean?,” *Mod. Pathol.*, vol. 28 Suppl 1, pp. S7-21, Jan. 2015.
- [88] R. T. Filippone, L. Sahakian, V. Apostolopoulos, and K. Nurgali, “Eosinophils in Inflammatory Bowel Disease,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 25, no. 7, pp. 1140–1151, Jun. 2019.
- [89] S. Al-Haddad, “The role of eosinophils in inflammatory bowel disease,” *Gut*, vol. 54, no. 12, pp. 1674–1675, May 2005.
- [90] H. Rosenberg, “Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN/RNase 2) and the Mouse Eosinophil-Associated RNases (mEars): Expanding Roles in Promoting Host Defense,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 15442–15455, Jul. 2015.
- [91] A. Wędrychowicz, P. Tomasik, S. Pieczarkowski, K. Kowalska-Duplaga, Z. Grzenda-Adamek, and K. Fyderek, “Clinical value of serum eosinophilic cationic protein assessment in children with inflammatory bowel disease,” *Arch. Med. Sci.*, vol. 6, pp. 1142–1146, 2014.
- [92] C. G. B. Peterson, P. Sangfelt, M. Wagner, T. Hansson, H. Lettesjö, and M. Carlson, “Fecal levels of leukocyte markers reflect disease activity in patients with ulcerative colitis,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 67, no. 8, pp. 810–820, Jan. 2007.
- [93] M. Wagner *et al.*, “Elevated fecal levels of eosinophil granule proteins predict collagenous colitis in patients referred to colonoscopy due to chronic non-bloody diarrhea,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 51, no. 7, pp. 835–841, Jul. 2016.
- [94] L. F. Pisani *et al.*, “Biomarkers and Microscopic Colitis: An Unmet Need in Clinical Practice.,” *Front. Med.*, vol. 4, no. May, p. 54, May 2017.
- [95] R. Nakov, V. Nakov, V. Gerova, and L. Tankova, “Fecal calprotectin correlates well with endoscopic activity in ulcerative colitis patients.,” *J. Gastrointestin. Liver Dis.*, vol. 27, no. 4, pp. 473–474, 2018.
- [96] U. von Arnim, T. Wex, C. Ganzert, P. Malfertheiner, and C. Schulz,

- “Fecal calprotectin: a marker for clinical differentiation of microscopic colitis and irritable bowel syndrome,” *Clin. Exp. Gastroenterol.*, vol. 9, no. 1, p. 97, Apr. 2016.
- [97] G. D’Haens *et al.*, “Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 18, no. 12, pp. 2218–2224, Dec. 2012.
- [98] M. Wagner *et al.*, “Fecal eosinophil cationic protein as a marker of active disease and treatment outcome in collagenous colitis: A pilot study,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 46, no. 7–8, pp. 849–854, Jul. 2011.
- [99] M. Camilleri, H. Halawi, and I. Oduyebo, “Biomarkers as a diagnostic tool for irritable bowel syndrome: where are we?,” *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 4, pp. 303–316, Apr. 2017.
- [100] J. A. Summers *et al.*, “Multicentre prospective survey of SeHCAT provision and practice in the UK,” *BMJ Open Gastroenterol.*, vol. 3, no. 1, p. e000091, May 2016.
- [101] G. H. Sauter, W. Münzing, C. von Ritter, and G. Paumgartner, “Bile acid malabsorption as a cause of chronic diarrhea: diagnostic value of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in serum,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 44, no. 1, pp. 14–9, Jan. 1999.
- [102] L. J. Donato, A. Lueke, S. M. Kenyon, J. W. Meeusen, and M. Camilleri, “Description of analytical method and clinical utility of measuring serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (7aC4) by mass spectrometry,” *Clin. Biochem.*, vol. 52, pp. 106–111, Feb. 2018.
- [103] I. Lyutakov, Ursini Francesco, Penchev Plamen, Caio Giacomo, Volta Umberto, De Giorgio, Roberto, “The diagnostic accuracy of different methods for the diagnosis of bile acid malabsorption: A Systematic review,” *Unpubl. data*, 2019.
- [104] Z. Li, Y. Long, M. Bai, J. Li, and Z. Feng, “Neutrophil and Eosinophil Granule Proteins as Potential Biomarkers of Assessing Disease Activity

- and Severity in Patients With Ulcerative Colitis,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 30, no. 5, pp. 776–778, Sep. 2016.
- [105] I. Masoodi, B. M. Tijjani, H. Wani, N. S. Hassan, A. B. Khan, and S. Hussain, “Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review.,” *Ger. Med. Sci.*, vol. 9, p. Doc03, Feb. 2011.
- [106] D. R. Hansberry, K. Shah, P. Agarwal, and N. Agarwal, “Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease.,” *Cureus*, vol. 9, no. 1, p. e1004, Jan. 2017.
- [107] A. Sonnenberg, K. O. Turner, and R. M. Genta, “Differences in the socioeconomic distribution of inflammatory bowel disease and microscopic colitis.,” *Colorectal Dis.*, 2016.
- [108] R. D’Inca’ and R. Caccaro, “Measuring disease activity in Crohn’s disease: what is currently available to the clinician,” *Clin. Exp. Gastroenterol.*, p. 151, May 2014.
- [109] L. Peyrin-Biroulet, E. V Loftus, J.-F. Colombel, and W. J. Sandborn, “The Natural History of Adult Crohn’s Disease in Population-Based Cohorts,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 105, no. 2, pp. 289–297, Mar. 2010.
- [110] D. Hommes, J.-F. Colombel, P. Emery, M. Greco, and W. J. Sandborn, “Changing Crohn’s disease management: Need for new goals and indices to prevent disability and improve quality of life,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 6, pp. S224–S234, Feb. 2012.
- [111] C. Zallot and L. Peyrin-Biroulet, “Deep Remission in Inflammatory Bowel Disease: Looking Beyond Symptoms,” *Curr. Gastroenterol. Rep.*, vol. 15, no. 3, p. 315, Mar. 2013.
- [112] L. Vitek, “Bile Acid Malabsorption in Inflammatory Bowel Disease,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 21, no. 2, pp. 476–483, Feb. 2015.
- [113] D. Jung, A. C. Fantin, U. Scheurer, M. Fried, and G. A. Kullak-Ublick, “Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor.,” *Gut*, vol. 53, no. 1, pp. 78–

84, Jan. 2004.

- [114] M. K. Borghede, J. M. Schlütter, J. S. Agnholt, L. A. Christensen, L. C. Gormsen, and J. F. Dahlerup, “Bile acid malabsorption investigated by selenium-75-homocholic acid taurine (75SeHCAT) scans: Causes and treatment responses to cholestyramine in 298 patients with chronic watery diarrhoea,” *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 22, no. 6, pp. e137–e140, Dec. 2011.
- [115] M. Kurien, E. Thurgar, A. Davies, R. Akehurst, and J. Andreyev, “Challenging current views on bile acid diarrhoea and malabsorption.,” *Frontline Gastroenterol.*, vol. 9, no. 2, pp. 92–97, Apr. 2018.
- [116] F. Magro *et al.*, “Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 11, no. 6, pp. 649–670, Jun. 2017.
- [117] F. Gomollón *et al.*, “3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn’s Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 11, no. 1, pp. 3–25, Jan. 2017.
- [118] S. J. Keely and J. R. F. Walters, “The Farnesoid X Receptor: Good for BAD,” *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 2, no. 6, pp. 725–732, Nov. 2016.
- [119] C. Maaser *et al.*, “ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 13, no. 2, pp. 144-164K, Feb. 2019.
- [120] З. Кръстев, З. Спасова, “Поведение, алгоритми, класификации в гастроентерологията. , ;,” по. София, pp. 154-174., 2012.
- [121] P. Rutgeerts, K. Geboes, G. Vantrappen, J. Beyls, R. Kerremans, and M. Hiele, “Predictability of the postoperative course of Crohn’s disease.,”

- Gastroenterology*, vol. 99, no. 4, pp. 956–63, Oct. 1990.
- [122] D. A. Drossman, “Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV,” *Gastroenterology*, vol. 150, no. 6, pp. 1262-1279.e2, May 2016.
- [123] “Диагностичен и терапевтичен алгоритъм (консенсус). Българско научно дружество по гастроентерология. Хронични възпалителни заболявания на червата – улцерозен колит и болест на Крон.,” *Българска хепатогastroентерология*, vol. кн.2, pp. 47–55, 2010.
- [124] A. Sturm *et al.*, “ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 13, no. 3, pp. 273–284, Mar. 2019.
- [125] Bühlmann Laboratories AG, “Bühlmann Laboratories AG. Quantum Blue Calprotectin: Quantitative lateral flow assay [pamphlet]. Schönenbuch: Bühlmann Laboratories AG;,” *pamphlet*, vol. Schönenbuch, 2009.
- [126] Immundiagnostik AG, “Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany. [Pamphlet],” *[Pamphlet]*, vol. Arbeitsanl, 2017.
- [127] N. Kalach *et al.*, “Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow’s milk allergy in toddlers,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 51, no. 2, Jan. 2013.
- [128] Thermo Fisher Scientific, “Thermo Scientific™ Human FGF-19 ELISA Kit [Pamphlet],” *Thermo Fish. Sci. Inc. USA*, 2015.
- [129] B. SIA, “Biosan SIA., Ratsupites 7, build. 2, Riga, LV-1067, Latvia [pamphlet],” *Pamphlet*, 2017.
- [130] B. P. M. Verhaegh *et al.*, “High risk of drug-induced microscopic colitis with concomitant use of NSAIDs and proton pump inhibitors,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 43, no. 9, pp. 1004–1013, May 2016.
- [131] E. H. Law, M. Badowski, Y.-T. Hung, K. Weems, A. Sanchez, and T. A.

- Lee, “Association Between Proton Pump Inhibitors and Microscopic Colitis,” *Ann. Pharmacother.*, vol. 51, no. 3, pp. 253–263, Mar. 2017.
- [132] E. Mosso, V. Boano, M. Grassini, E. Battaglia, and R. Pellicano, “Microscopic colitis: a narrative review with clinical approach,” *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, vol. 65, no. 1, Jan. 2019.
- [133] A. Bajor, H. Törnblom, M. Rudling, K.-A. Ung, and M. Simrén, “Increased colonic bile acid exposure: a relevant factor for symptoms and treatment in IBS,” *Gut*, vol. 64, no. 1, pp. 84–92, Jan. 2015.
- [134] P. Hegyi, J. Maléth, J. R. Walters, A. F. Hofmann, and S. J. Keely, “Guts and Gall: Bile Acids in Regulation of Intestinal Epithelial Function in Health and Disease,” *Physiol. Rev.*, vol. 98, no. 4, pp. 1983–2023, Oct. 2018.
- [135] L. C. Coppi *et al.*, “Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn’s disease.,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 211–8, Feb. 2007.