

**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**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На 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, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 219 стандартни печатни страници, онагледен с 30 фигури и 81 таблици. Библиографията съдържа 135 заглавия, от които 11 на кирилица и 124 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации и 10 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по гастроентерология – Медицински университет – София на 30.09.2019 г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. Борислав Георгиев Владимиров, д.м. - Катедра по гастроентерология на Медицински факултет при МУ-София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ - вътрешен член за МУ-София
2. Доц. Антония Йорданова Атанасова, д.м. – Катедра по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет Варна – външен член за МУ-София

Становища:

1. Доц. Пламен Иванов Пенчев, д.м. - Катедра по гастроентерология на Медицински факултет при МУ-София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ - вътрешен член за МУ-София
2. Проф. Симеон Георгиев Стойнов, д.м.н. - Втора вътрешна клиника с отделения по гастроентерология и пулмология към Аджибадем Сити Клиник Токуда Болница - външен член за МУ-София
3. Доц. д-р Милко Божидаров Мирчев, д.м. – Втора Катедра по вътрешни болести на Медицински университет Варна – външен член за МУ-София

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по гастроентерология, УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, МУ-София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 13.12.2019 г. от 15.00 часа в аудиторията на Катедра по гастроентерология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, МУ-София.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. СЪКРАЩЕНИЯ	6
2. ВЪВЕДЕНИЕ	9
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
3.1 Цел	10
3.2 Задачи	10
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
4.1 Групи изследвани лица по диагнози	11
4.1.1 Група 1 (Active IBD) – Болест на Крон и Улцерозен колит в активност	11
4.1.2 Група 2 (IBD in Remission) – БК и УК в ендоскопска ремисия и налична хронична водниста диария	13
4.1.3 Група 3 (IBD after surgery) – БК и УК след хирургична интервенция с хронична водниста диария	13
4.1.4 Група 4 (IBS-D) – Синдром на дразнимото черво с диария	14
4.1.5 Група 5 (MC) – Микроскопски колит (МК)	15
4.1.6 Група 6 – Здрави доброволци (Контролна група)	15
4.2 ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ	15
4.2.1 Включващи и изключващи критерии	15
4.2.2 Анамнеза и физикален статус на пациентите и контролите	16
4.2.3 Изследване на фекален калпротектин	16
4.2.4 Изследване на фекален Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX)	16
4.2.5 Изследване на жлъчни киселини във фецес - total free faecal bile acids (TFFBA)	17
4.2.6 Изследване на серумен fibroblast growth factor 19 (FGF-19)	18
4.2.7 Видеогастроскопия с вземане на материал за хистологично изследване от дванадесетопръстника	18
4.2.8 Видео илеоколоноскопия с вземане на хистологичен материал от терминален илеум и дебело черво	19
4.2.9 Протокол за вземане на биопсии при микроскопски колит	19

4.2.10	Хистологична оценка на биопсичен материал от терминален илеум и дебело черво	20
4.2.11	Статистически методи	20
4.2.12	Етични норми	21
5.	РЕЗУЛТАТИ	22
5.1	Диагностичен алгоритъм за клинична оценка на пациенти с хронична водниста диария	22
5.1.1	Анализ на специфичния въпросник (анкета) за съставяне на диагностичен алгоритъм при пациенти с хронична диария	22
5.1.2	Микробиологично и паразитологично изследване на фецес	27
5.1.3	Алгоритъм за пациенти с хронична диария	27
5.2	Микроскопски колит (МК)	29
5.2.1	Дескриптивна статистика на МК	30
5.2.2	МК и прием на медикаменти (НСПВС, Сартани, ППИ)	33
5.2.3	Тютюнопушене, холецистектомия и CRP при МК	35
5.2.4	Ендоскопски изменения при МК	35
5.2.5	Хистологични резултати от биопсия на дебело черво	37
5.2.6	Горно-ендоскопско изследване (ФГС) при МК	39
5.2.7	Хистологични резултати от дуоденална биопсия при МК	40
5.3	Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) и фекални жлъчни киселини (TFFBA)	41
5.3.1	Определяне на чувствителността и специфичността на FGF19 за откриване на МЖК при IBD и МК	43
5.3.2	IBD в активност и FGF19	44
5.3.3	IBD (remission) в ремисия с необяснима хронична диария и стойностите на серумния FGF19	44
5.3.4	IBD (IR-CD и IPAA) след хирургична интервенция и FGF19	44
5.3.5	IBS-D и FGF19	44
5.3.6	Микроскопски колит (МК) и FGF19	45
5.4	Eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX)	45
5.4.1	EDN/EPX при пациенти с ХВЗЧ в активност (IBD Active)	46

5.4.2	Комбиниран ROC анализ със зона под кривата (AUC) при комбиниране на ФКП и EDN/EPX	49
5.4.3	Разпределение на END/EPX по групи пациенти	50
5.4.4	EDN/EPX и МК	50
5.5	Сравнителен анализ на FGF19, TFFBA, EDN/EPX спрямо ФКП клинични и ендоскопски маркери за тежест на диарията	51
5.5.1	Анализ на клиничните данни за тежестта на хроничната диария в нашата кохорта	51
5.5.2	EDN/EPX спрямо ФКП и CRP (като маркери на възпаление)	52
5.5.3	Линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП	52
5.5.4	Индекси за оценка на болестна активност и оценка тежестта на диарията (CDAI, Mayo score и SI) - корелация със стойностите на EDN/EPX	54
5.5.5	Корелация между EDN/EPX и ФКП	56
5.5.6	Сравнение на END/EPX с периферния брой на Еозинофили в кръвта	60
5.5.7	Микроскопски колит срещу IBS-D (ROME IV критерии), нощна диария, демографски показатели (възраст, пол)	61
5.5.8	FGF-19 спрямо Stool Index и честотата на изхожданията при Микроскопски колит (МК)	62
5.5.9	Маркери за МЖК (FGF-19 и TFFBA) спрямо ФКП	62
5.5.10	Корелация между FGF-19 със stool index (SI) и честота на изхожданията (със или без корекция на маркерите за чревното възпаление)	63
5.6	БК и УК в ендоскопска ремисия и налична необяснима хронична водниста диария	64
5.6.1	FGF19 и IBD в ремисия с необяснима хронична диария	64
5.6.2	Диагностична точност на FGF-19 за откриване на МЖК при IBD в ремисия с необяснима хронична диария	65
5.6.3	Корелация на FGF-19 спрямо Stool Index при пациенти в IBD ремисия	65
5.7	БК и УК след хирургични интервенции (десностранна хемиколектомия, тънкочревна резекция или IPAA)	66
5.7.1	Разпределение по типа операция и стойностите на FGF-19	67
5.7.2	Корелация между FGF-19 и тежестта на диария при IBD след хирургична операция	69

5.7.3	Маркери на чревно възпаление при оперирани IBD болни	69
5.7.4	Корелация между EDN/EPX и CDAI при оперирани болни	70
6.	ДИСКУСИЯ	71
7.	ИЗВОДИ	82
8.	ПРИНОСИ	83
9.	СТРАТЕГИЯ И ПОДХОД ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНА ВОДНИСТА ДИАРИЯ	84
10.	ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	85
10.1	Публикации във връзка с дисертацията	85
10.2	Международни участия на конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията	85
10.3	Национални конгреси и участия във връзка с дисертацията	86
11.	ПРИЗНАТЕЛНОСТ	87

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 – Тънкочревен бактериален свръхрастеж

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. 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.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1 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.

3.2 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 IPAA).

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1 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. (22-87 г.), и 11 здрави доброволци (6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41 г. \pm 14 г., 22-61 г.) 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

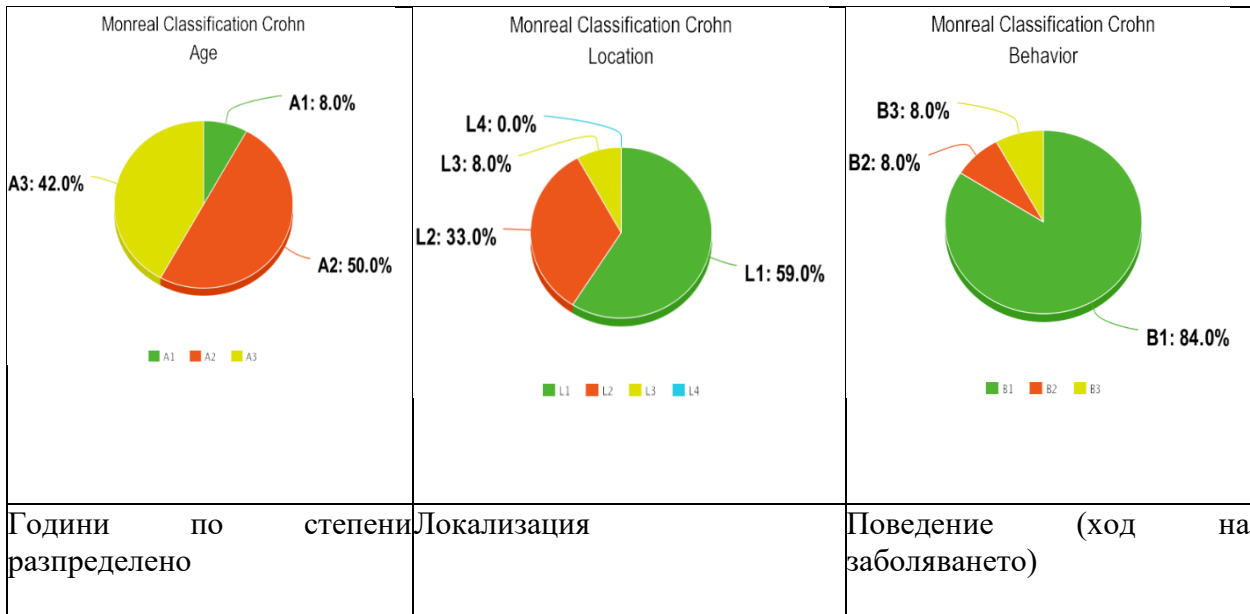
Група 5 - (MC) – Микроскопски колит (МК)

Група 6 - (Healthy subjects) - Здрави доброволци (здрав контрол)

4.1.1 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. Ендоскопската активност е определена като наличие на лигавични изменения (ерозии, язви, афти) по време на илеоколоноскопията.

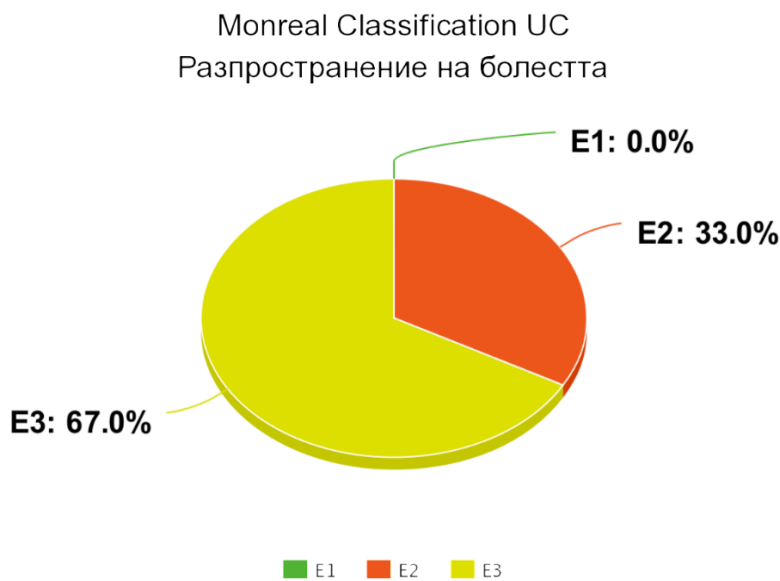
Локализацията на БК се преценени чрез класификация от Монреал 2005 г. от които пациентите с БК (8%) са диагностицирани като (A1), n=6 (50%) – като (A2) и 5 (42%) са стадиранни като (A3). При n=7 (59%) пациенти са с локализация на болестта в илеума (L1), n=4 (33%) – с колонна локализация (L2) и n=1 (8%) – 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 1**). При 1 (8%) имат перианална болест. При 60% от пациентите се класифицират като A2 L1 B1.



Фигура 1. 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. Клиничната и ендоскопската активност е оценена чрез Endoscopic Mayo score (EMS).

Разпространението и тежестта на заболяването са преценени чрез класификацията от Монреал от 2005 г. 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 2**).



Фигура 2. 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].

4.1.2 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. Диагнозата БК е поставена по установените критерии и Монреалската класификация, от които пациентите с БК е n=1 (11%) са диагностицирани като (A1), n=7 (78%) като (A2) и n=1 (11%) са стадираны 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 периаанална болест.

Диагнозата УК е поставени на базата на стандартните клинични, ендоскопски и хистологични критерии. Клиничната и ендоскопската активност е оценена чрез EMS.

Разпространеността и тежестта на заболяването са преценени чрез класификацията от Монреал от 2005 г. 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. При пациенти в ендоскопска и биохимична ремисия с необяснима хронична водниста диария изследвахме серумните и фекалните биомаркери (FGF19 и TFFBA), като сравнихме биомаркерите за чревно възпаление EDN/EPX с установения стандарт ФКП [7][6].

4.1.3 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 IPAA). 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. 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 – постхирургична 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 (IPAA) и се потвърждава проходимостта на анастомозите. Всички от изследваните пациенти с IPAA 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.

4.1.4 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 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 патоанатома 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.

4.1.5 Група 5 (МС) – 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 клиничко-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 глутенова ентеропатия. При всички пациенти от тази група са изследвани и серумните нива на TSH.

4.1.6 Група 6 – Здрави доброволци (Контролна група)

Като контроли са включени 11 здрави доброволци, 6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41 г. ± 14 г. (22-61 г.) 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%).

4.2 ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

4.2.1 Включващи и изключващи критерии

Включващите критерии за настоящото проучване бяха: (1) възраст над 18 г, (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.

4.2.2 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 в която да попълват приема на медикаменти и да отговорят на серия на въпроси свързани с евентуално откриване на причината за тяхната хронична диария.

4.2.3 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].

4.2.4 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 високо афинитетни 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 античовешки 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).

4.2.5 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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- α -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 ($\mu\text{mol/g}$).

4.2.6 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 пикограм на 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 правопрпорционален на първоначалното количество FGF-19 в биологичната проба.

4.2.7 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 глутенова ентеропатия. При всички пациенти с доказана БК и при тези с УК, за които е преценено, че е необходимо, е извършена видео гастродуоденоскопия 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 десценденс“ 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.

4.2.8 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 10-15 см. 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. 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.

4.2.9 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 взема 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.

4.2.10 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 формалинови 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].

4.2.11 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 $p < 0.05$.

4.2.12 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.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 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 3. 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. (22-87 г.), и 11 здрави доброволци (6 мъже и 5 жени, на средна възраст 41 г. \pm 14 г., 22-61 г. Всички участници в проучването са попълнили анкетна карта (въпросник). 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 5-1. 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	

5.1.1 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 5-2), 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 разгледани на (Таблица 5-2).

Бристол скалата при различните групи

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

Таблица 5-2 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 проведения 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 5-3). При проведения Chi-Square Test (тест за асоциации) установяваме статистическа разлика между групите, като при IBD active е по-изразено кървенето ($p < 0.001$) (Таблица 5-4). 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 5-6).

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 5-3. Докладване на кръв в изпражненията от пациентите в различните групи

	Стойност	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Chi-Square test			
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 5-4. 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 5-6). 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 анал-анастомоза (ПАА) ($p < 0.001$). 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 5-5). Няма докладвана друга съществена коморбидност при изследваните групи пациенти.

Друга придружаваща патология		IBD Active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	МК	НС	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 5-5. 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 нестероидни 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 5-15**) (**Таблица 5-16**).

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 5-17**) (**Таблица 5-18**). 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 5-8**).

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 5-6. 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 5-7. Chi-Square тест за слуз в изхожданията

Дескриптивно Фактори		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 ИПП	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 5-8. 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 3), 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%) ($p < 0.001$).

5.1.2 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 5-9.)

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 5-9. 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

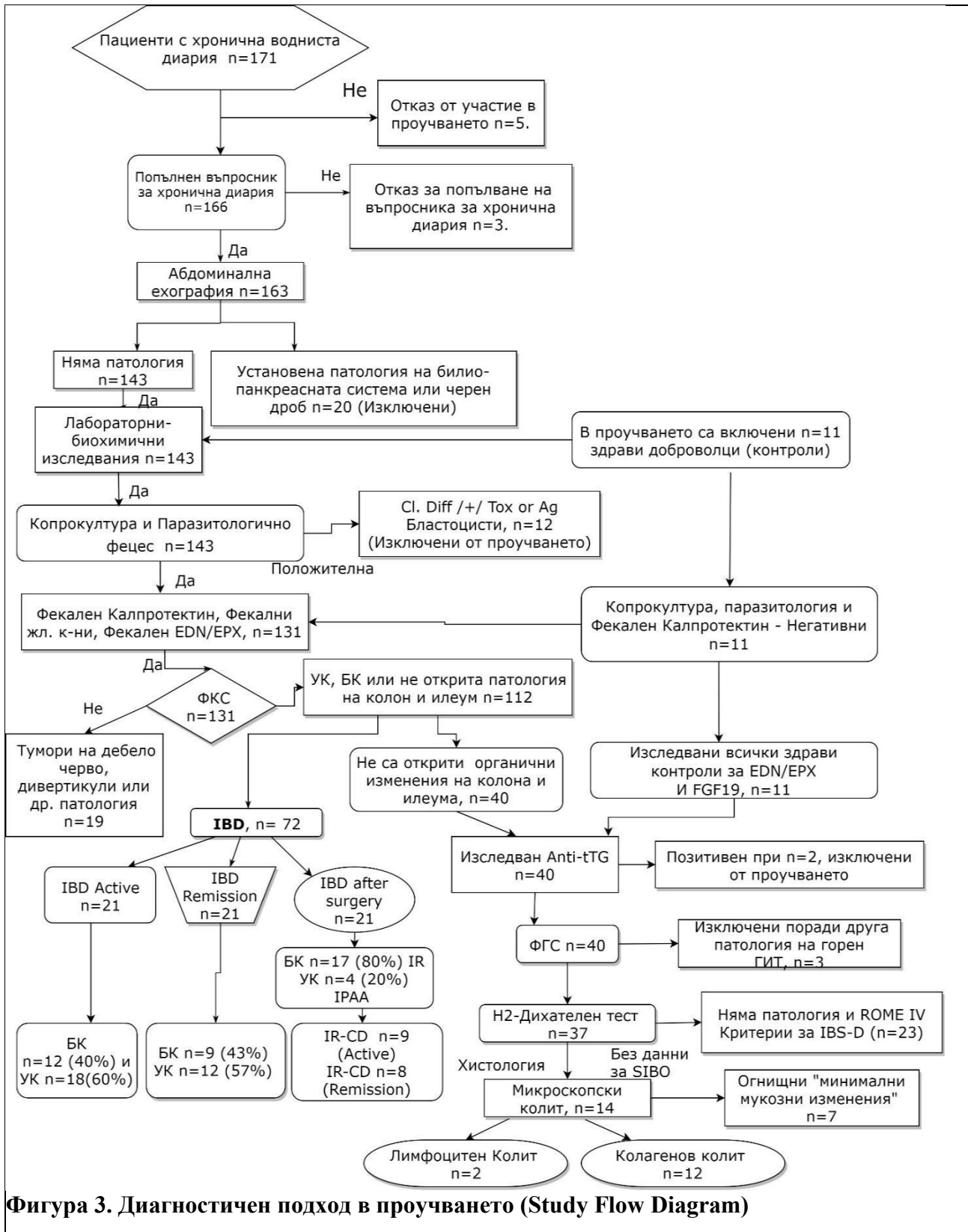
Таблица 5-10. Паразитологично изследване на фецес при всички пациенти

5.1.3 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 17 (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 3. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)**. За целта при всички пациенти се проведе анкетно проучване с текущия въпросник 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 3. Диагностичен подход в проучването (Study Flow Diagram)

5.2 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.**), като при n=14 (12.8%) от тези пациенти беше поставена диагнозата микроскопски колит (МК) от двама независими патологоаниатоми. 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 открихме хистологичните критерии за МК и бяха включени в групата на IBS-D. Средната възраст на пациентите с МК беше 60.3г. ± 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 ($p < 0.001$).

5.2.1 Дескриптивна статистика на МК

В групата с хистологично доказан МК установихме сигнификантно завишени средни стойности на ФКП 221µg/g, което е по-високо от средното ниво на ФКП при здрави контроли и IBS-D групата ($p = 0.047$) (Таблица 5-11) и (Таблица 5-12).

Маркери на чревно възпаление и МЖК	IBD active	IBD in remission	IBD after surgery	IBS-D	MC	Healthy subjects	P value
CRP, mean ± SD	1.260a ± 2.47	0.323a,b ± 0.23	0.436a,b ± 0.35	0.189b ± 0.16	0.551a,b ± 0.35	0.310a,b ± 0.28	$p = 0.031$
Фекален Калпротектин, mean ± SD	750a ± 465	81b ± 39	375.000c ± 264	47.b ± 38	221b,c ± 279	43b ± 23	$p < 0.001$
Фекални жлъчни к-ни, mean ± SD	42.000a ± 19.453	37.576a ± 14.135	40.195a ± 20.955	40.882a ± 20.363	40.627a ± 25.42	44.072a ± 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 5-11. 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 5-12. Дескриптивна статистика свързана с диаричните изхождания на пациентите с МК и останалите групи

При всички пациенти с МК бяха проведените H2-дихателни тестове с лактулоза (n=14) като само при n=3 пациента се установи скъсено оро-цекално транзитно време и не установихме статистическа значимост в тази група пациенти спрямо тези с IBD ($p = 0.584$).

На (Таблица 5-12) представяме клиничните характеристики на диаричния синдром при МК, като се установихме, че средният брой на изхождания дневно е 9/дн. \pm 3, като SI е 63 \pm 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, слуз в изхождания и кръв в изхождания, които са докладвани от пациентите посредством анкетата за хронична диария. От получените резултати установихме, че 50% от пациентите с IBS-D и МК докладват за загуба на повече от 5 кг 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 слуз в изхожданията. Всички резултати са представени на (Таблица 5-14).

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
Премишни 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 5-13. Тютюнопушене сред всички групи пациенти. Няма статистически значима разлика Chi-square test ($p = 0.442$)

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 5-14. Дескриптивни 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 5-5**).

5.2.2 МК и прием на медикаменти (НСПВС, 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 ($p < 0.001$) (Таблица 5-15) (Таблица 5-16).

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 5-15. 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 5-16. 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 5-17) (Таблица 5-18)

Прием на ИПП	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 5-17. Прием на ИПП 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 5-18. Chi-Square test за значимост при приема на ИПП сред изследваните групи

Илеоколоноскопия Ендоскопски изменения	Групи					Общо
	IBD - Active	IBD in Remission	IBD After Surgery	IBS-D	MC	
Нормална Ендоскп. 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, infection, 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 remission	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 5-19. Дескриптивни данни за ендоскопските изменения открити при различните групи пациенти

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 5-20. 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 антихипертензивната група медикаменти „сартани“, което е статистически значимо спрямо останалите групи, които не са докладвали никакъв прием на сартани ($p = 0.009$) (виж. **Таблица 5-20**). В проведеното проучване нито един от изследваните пациенти не е приемал лаксативи (100%).

5.2.3 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, непушачи и пушачи ($p = 0.442$) (**Таблица 5-13**). 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 ($p = 0.070$).

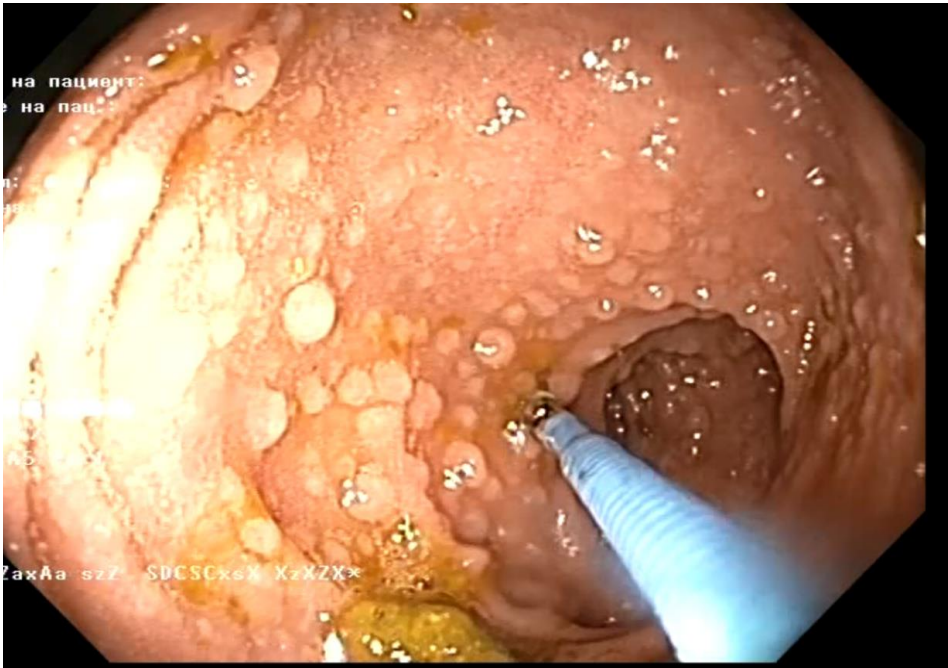
5.2.4 Ендоскопски изменения при МК

На (**Таблица 5-19**) 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 5-21**).

Chi-Square test за ендоскопските изменения	Стойност	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	289,792a	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 5-21. Chi-square test за взаимовръзка между ендоскопските изменения при различните групи пациенти.



Фигура 4. Лимфоликуларна реакция в терминалния илеум на пациент с КК и вземане на биопсия.

Ендоскопски образ от терминален илеум при пациенти с КК (Фигура 4).

На (Фигура 5) 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. 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 5. Фоликул в терминален илеум чрез използването на NBI и разграничаване на покривния тънкочревен епител

5.2.5 Хистологични резултати от биопсия на дебело черво

Използвахме хистологична оценка от двама независими патоанатоми 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 5-23). 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 5-23) (Таблица 5-24).

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 5-22. 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
MC	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 5-23. 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 и при другите групи ($p = 0.704$). 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 5-24. 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 5-25. Средни стойности на колагенов слой при МК и IBS-D

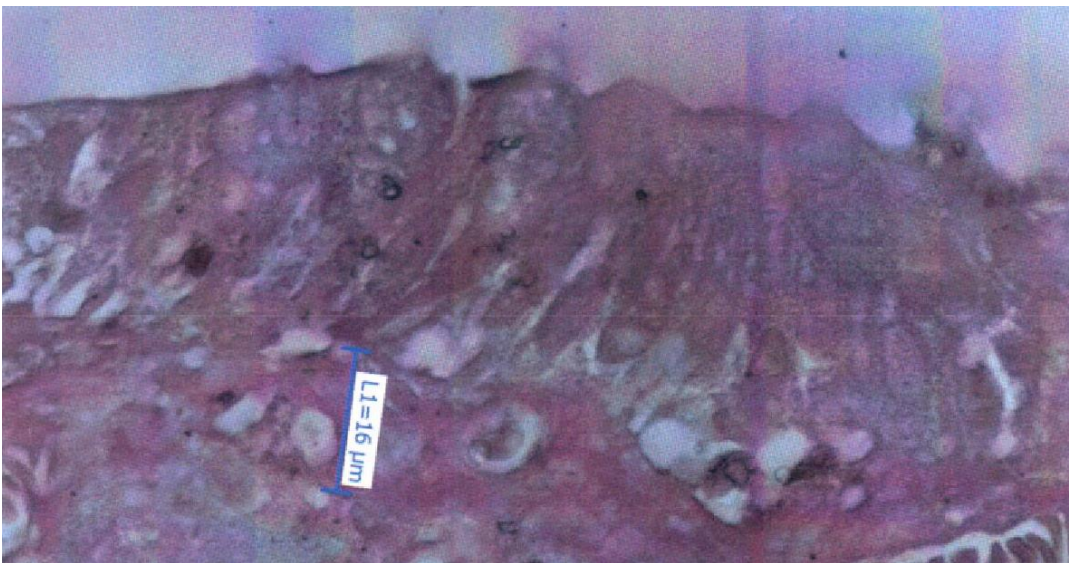
Измерването на дебелината на колагеновия слой е извършено с окуляр микрометър при което патолозите докладваха при $n=12/14$ (85%) от пациентите с МК увеличен колагенов слой. Те бяха класифицирани като КК. Средната стойност на размера на колагеновия слой беше $16\mu\text{m}$ при МК, докато при IBS-D средният размер на колагеновия слой е $2.35\mu\text{m}$, като се установява значителна статистическа разлика между двете групи ($p = 0.033$) (Таблица 5-25)(Таблица 5-26).

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 I	
	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	38	

Таблица 5-26. Размера на колагеновия слой при всички изследвани пациенти с МК и IBS-D

На (Фигура 6) и (Фигура 7) 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 6. Хистологичен препарат от КК и измерената дебелината на колагеновия слой.



Фигура 7. 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 5-27**).

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 5-27. 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 ($p = 0.645$)

5.2.6 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 5-28**). Не установихме статистическа значима разлика между

различните групи пациенти и резултатите от ендоскопския протоколи при другите групи ($p = 0.063$) (виж Таблица 5-29).

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 5-28. 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 5-29. Не се установява статистическа взаимовръзка между резултатите от различните ендоскопски протоколи между различни групи изследвани пациенти

5.2.7 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 5-30). 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 5-30. 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 5-31. Статистически значима взаимовръзка между хистологичните резултати при различните групи пациенти от дуоденална биопсия на МК (Chi-Square test)

5.3 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 IPAA 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 5-32**), 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
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	221.285b, c \pm 279.933 \pm	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 5-32. Дескриптивна статистика на резултатите на FGF19 и TFFBA в различните групи пациенти

При изследваните взаимовръзки установяваме сигнификантна разлика в средните стойности 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, MC и тези IBS-D ($p = 0.031$, $p < 0.001$), като взаимовръзката с FGF19 беше използвана за да се отграничат пациентите с чревно възпаление.

5.3.1 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 5-33) 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 5-33. Диагностичната точност на FGF19 спрямо здрави контроли

5.3.2 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 5-33).

5.3.3 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 5-33).

5.3.4 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.

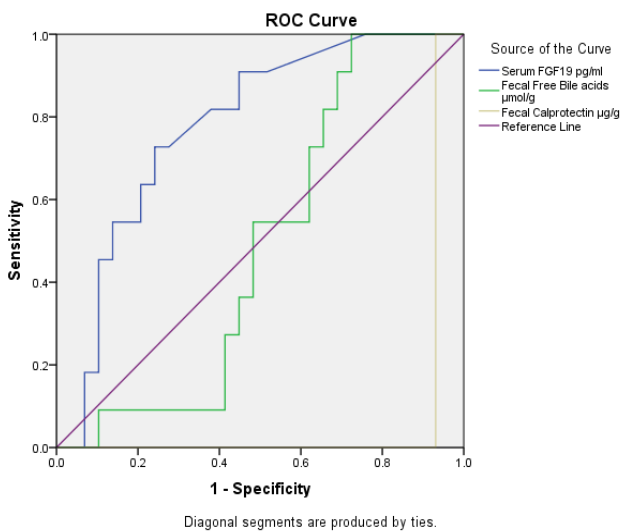
5.3.5 IBS-D и FGF19

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 ($p = 0.315$).

5.3.6 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 $\leq 30.04 \text{ pg/mL}$ 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 8) 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 8 ROC крива с анализ на FGF 19 (pg/ml), фекалните жлъчни киселини ($\mu\text{mol/g}$) и Фекалния калпротектин ($\mu\text{g/g}$) за откриване на МЖК

5.4 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 IPAA 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 5-34) 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 5-37).

Диагноза	Брой пациенти	EDN/EPX (ng/ml)				Fecal Calprotectin ($\mu\text{g/g}$)				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.МК	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 5-34. 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 5-34).

5.4.1 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 µg/g)	83.3%	0.001	52	78%	72.7%	2.86	0.3	96.59%	25%

Таблица 5-35. 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 µg/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 5-35**). 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 5-36**).

	<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%

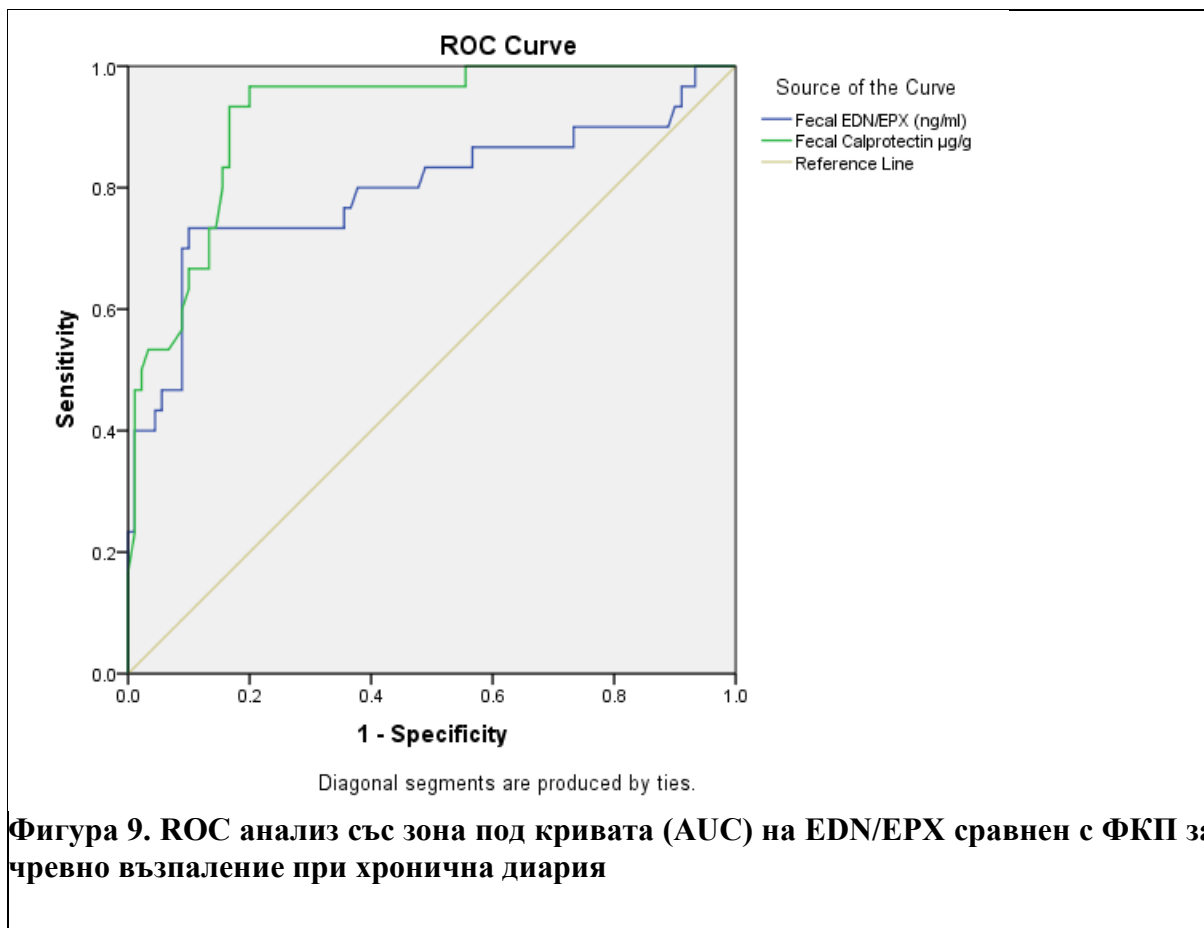
Таблица 5-36. Чувствителност и специфичност на ФКП при (cut-off) 100 µg/g, EDN/EPX и CRP за чревно възпаление при пациенти с хронична диария

За да определим диагностичната точност на ФКП (100 µg/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 9**).

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 9**).

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

Таблица 5-37. Стойности на EDN/EPX и FCP при диагнозите БК и УК сравнени при пациенти в активност или ремисия



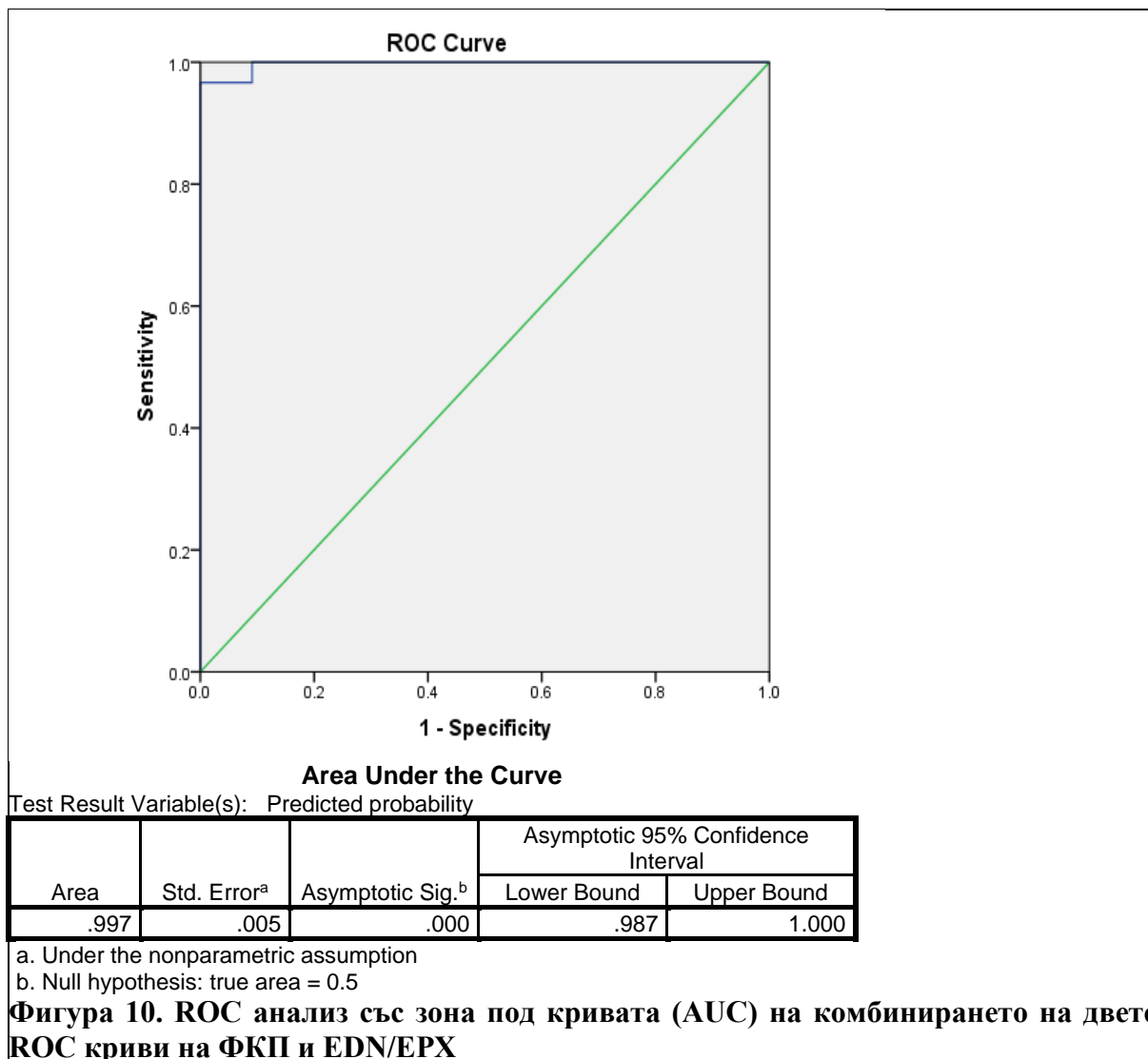
Фигура 9. ROC анализ със зона под кривата (AUC) на EDN/EPX сравнен с ФКП за чревно възпаление при хронична диария

ФКП с прагова стойност (cut-off) 100 µg/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 ($p < 0.001$).

5.4.2 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 10).



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 (ассигасу) за откриване на пациенти с чревно възпаление с 85.73% (виж. **Фигура 11**).

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

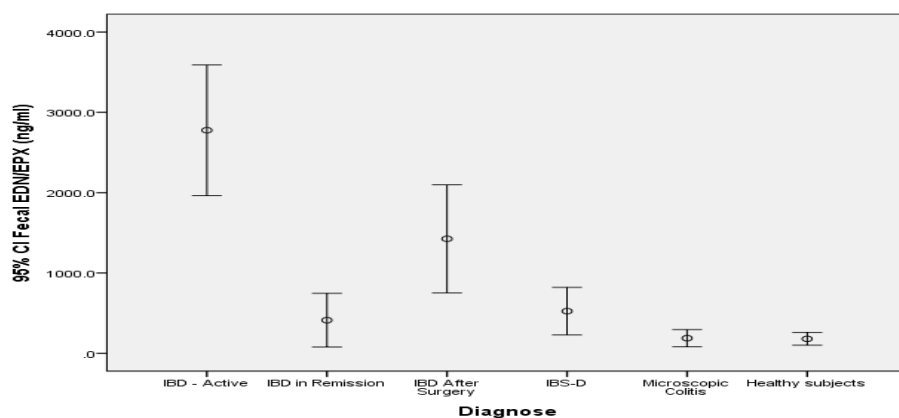
5.4.3 Разпределение на END/EPX по групи пациенти

Стойностите на EDN/EPX са представени при различните групи пациенти на (Фигура 12) и (Фигура 13), като е използван Kruskal–Wallis ANOVA тест за определяне на хоризонталните точки при всички пациенти.

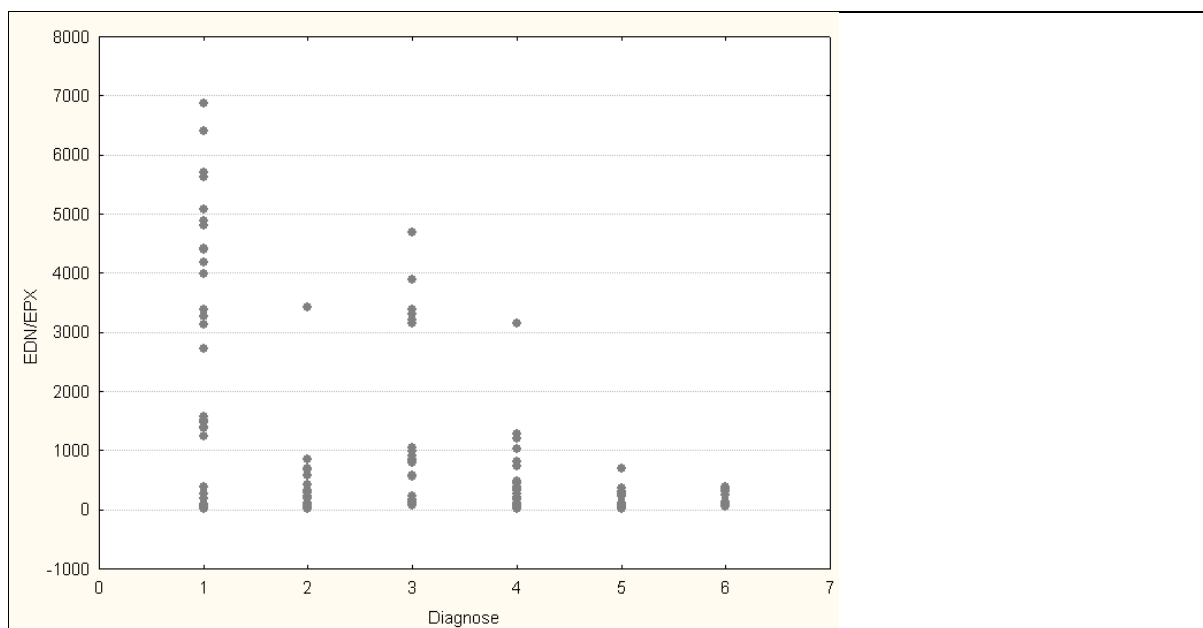
Най-високи средни стойности установихме при IBD-Active и IBD след хирургична интервенция, което корелира със стойностите на ФКП и има същото разпределение както при ФКП в различните групи ($p = 0.420$).

5.4.4 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 12. Разпределение на стойностите на END/EPX по групи



Фигура 13. Нива на EDN/EPX при различните групи пациенти 1- IBD Active, 2 – IBD Remission, 3 – IBD after surgery, 4 – IBS-D, 5 – МК и 6 - здрави контроли*

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

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

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

Средната докладвана честота на изхожданията дневно чрез използвания въпросник 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 5-38). 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 $60\text{г.} \pm 17\text{ г.}$ 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 \pm SD	45a \pm 13	50a,b \pm 15	48a,b \pm 17	46a,b \pm 15	60b \pm 17	41a \pm 17	$p = 0.117$
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	$p < 0.001$

Таблица 5-38. Сравнение между stool index и честотата на изхожданията при различните групи пациенти

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

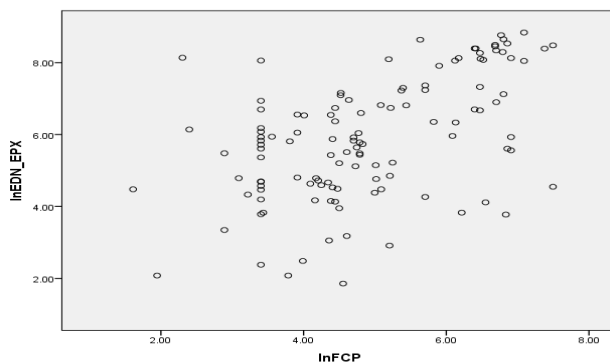
	Fecal Calprotectin			Fecal EDN/EPX		
	Mean	10 th and 90 th percentile		Mean	10 th and 90 th percentile	
IBD Active	750.93	192.50	1560.00	2777.027	50.840	5693.400
IBD in Remission	81.33	23.40	142.00	412.152	19.520	816.480
IBD After surgery	375.00	71.40	775.60	1425.086	100.320	3793.440
IBS-D	47.51	8.60	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 5-39. Средни стойности на ФКП и EDN/EPX

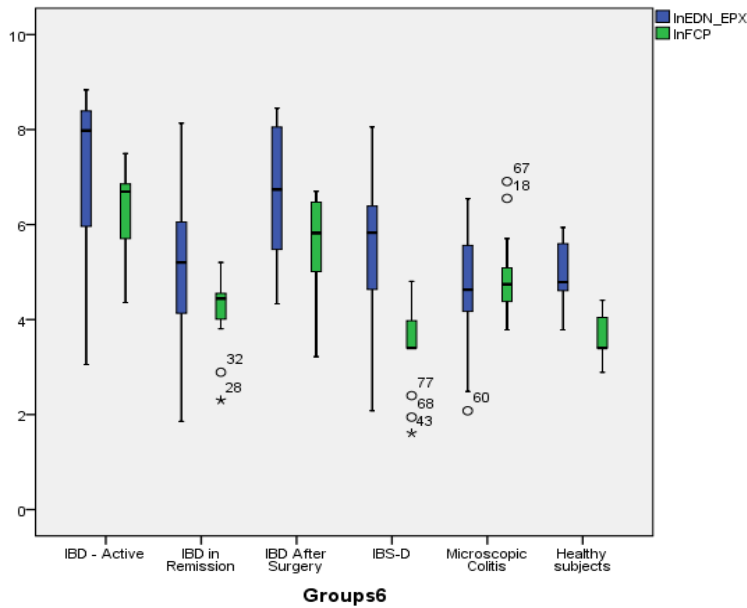
На (Таблица 5-39) установихме корелация между средните стойности и 10-ти и 90-ти перцентил на ФКП и EDN/EPX, като между двата маркера.

5.5.3 Линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП

На (Фигура 14) изобразяваме 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 14. Логаритмуваните стойности на маркерите при линеен регресионен анализ между EDN/EPX и ФКП.



Фигура 15. Box-plot анализ на логаритмичните стойности на EDN/EPX и ФКП при различните групи пациенти

На (Фигура 15) установихме подобно разпределение на логаритмувани стойности на EDN/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 $\mu\text{g/g}$	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 5-40. 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 5-40) и (Таблица 5-41).

		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 5-41. 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 5-42) и (Таблица 5-43).

Групово разпределение на фекалните маркери					
	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Fecal Calprotectin $\mu\text{g/g}$	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 5-42. 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 5-43. Levene's Test for Equality of Variances за IBD active и здрави контроли

5.5.4 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 5-44). 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 5-44) (Таблица 5-48).

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 5-45).

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 5-44. 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 5-45. Корелация между EDN/EPX със Stool Index и Stool frequency/day

На (Таблица 5-46) 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 ($p = 0.050$).

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 5-46. 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 5-47**).

	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 5-47. Анализ на индексите за оценка на болестна активност при IBD

5.5.5 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 5-48**. 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 5-48**). 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 5-48. 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 5-49.) 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 редукцията на килограмите на всички пациенти. Установихме, че стойностите на EDN/EPX имат значима корелация със степента на редукция 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 5-49. Корелация на EDN/EPX с IPAA, Crohn after surgery (IR-CD), ROME IV критериите и редукцията 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 5-50). Изследвахме зависимостта между стойностите на EDN/EPX и описаните ендоскопски изменения при пациенти с резекция на терминален илеум и ИРАА ($p = 0.022$, $p = 0.035$). 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 патологоанатомичните 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 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 5-50. 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 5-51. 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 5-51) 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 5-53) 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 5-52)($r=0.373$, $p =0.042$).

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 5-52. 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 5-53).

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	-0.449	.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 5-53. 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 ($r=0.729$, $p < 0.001$).

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 5-55** 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 5-54. 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 5-55. Сигнификантна зависимост между EDN/EPX и FCP при пациенти с IBD Active и IBD in remission (Levene's Test for Equality of Variances).

5.5.6 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 5-56).

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 5-56. 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.

5.5.7 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 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 оказа 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 г. \pm 17 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 5-57).

	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 \pm SD	45a \pm 13	50a,b \pm 15	48a,b \pm 17	46a,b \pm 15	60b \pm 17	41a \pm 17	$p = 0.117$

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	$p < 0.001$
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)	$p < 0.001$
Нощни дефекации, n (%)	23a (76)	4a,b (19)	10a (47)	2b (8.7)	9a (64)	0 (0)	$p < 0.001$
Диария при 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 5-57. Сравнителна характеристика на маркерите за тежест на диарията спрямо отделните групи

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

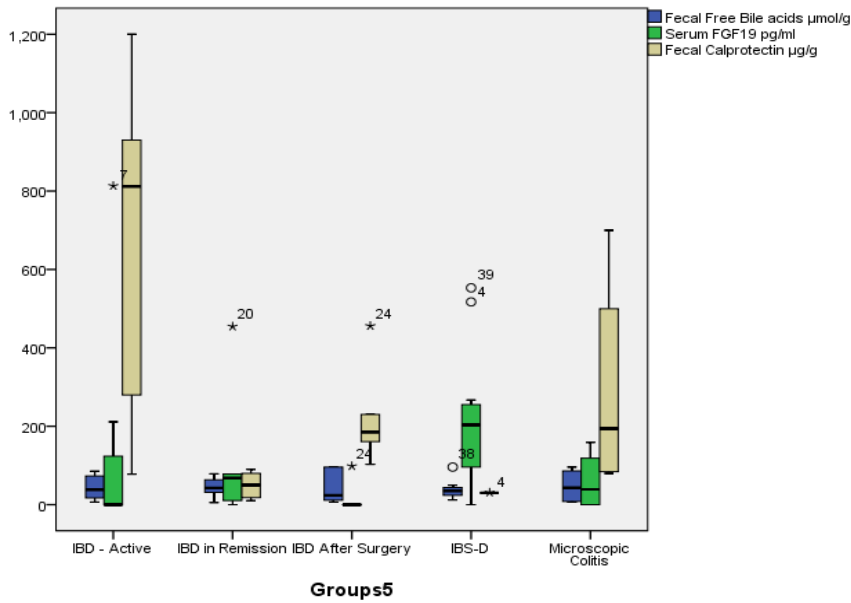
Средната честота на изхожданията дневно на пациенти с МК е 9.29/дн. и SI 63 ± 25 , при което стойностите на FGF-19 са под $\leq 30,04$ pg/mL. при $n=10/14$ (71%) от пациентите с МК. При същата група наблюдавахме значителна статистическа асоциация и отрицателна корелация между размера на субепителния 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 5-58).

FGF-19 корелация с MC	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 5-58. Корелация на FGF-19 с колагеновия слой (с или без корекция)

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

Основните характеристики на FGF-19, TFFBA и ФКП са отразени на (Фигура 16), 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 5-33).



Фигура 16. Box-plot анализ на стойностите на FGF19, TFFBA и ФКП при различните групи пациенти

5.5.10 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 уни вариабилен 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 5-59).

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 изхождания/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	$r = -.208, p = 0.211$	$r = -0.124, p = 0.477$
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 5-59. 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 5-59).

5.6 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) $81.33\mu\text{g/g} \pm 39.70$ SD и значително по-нисък спрямо IBD active ($p < 0.001$). Не се установи сигнификантна разлика в стойностите на ФКП ($81,33\mu\text{g/g} \pm 39.70$) при IBD в ремисия спрямо здравите контроли ($43\mu\text{g/g} \pm 23\text{SD}$) ($p = 0.21$). 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.

5.6.1 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 ≤ 114.07 pg/mL. и $n=8/12$ (66%) с УК има стойности по-ниски от FGF-19 < 114.07 pg/mL., като това прави общо 16/21 (76%) пациентите в IBD ендоскопска ремисия имат биохимични данни за МЖК, ако използваме FGF-19 ≤ 114.07 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 5-60).

	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)	$p = 0.435$
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 5-60. 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 ($p = 0.315$).

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

Задахме стойност от FGF19 $\leq 114,07$ pg/mL. за прагова (Cut-off) сравнена с контролната група (здравни 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 5-33).

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

При тази група пациенти установихме, наличие на обратна корелация между серумните стойностите 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 5-61. FGF-19 корелира със SI и честотата на изхождания при IBD ремисия. Проведена корекция на възпалителните компоненти (corrected)

5.7 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 5-62). 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 5-62. Брой пациенти оперирани чрез J-pouch анална анастомоза (IPAA) сравнено с другите пациенти от IBD групите.

Установихме, 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 5-63) и (Таблица 5-64).

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

Таблица 5-63. 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 5-64. Chi-Square Test за откриване на взаимовръзка при маркерите на чревно възпаление между групите с БК в активност и ремисия.

5.7.1 Разпределение по типа операция и стойностите на FGF-19

На (Таблица 5-65) 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 \pm 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 \pm 400	2139 \pm 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 \pm 21.65	43 \pm 23	179 \pm 118

Таблица 5-65. 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 ≤ 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-ресецираните 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 5-65), 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 патолофизиологична 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 ПАА $n=4$, 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 ПАА 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 ≤ 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 5-65).

5.7.2 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 5-66). 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 5-66. Корелационен анализ на FGF-19 и SI (stool frequency/day) при IBD резидирани				

5.7.3 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 ($140.55 \pm 95 \mu\text{g/g}$), 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 sample 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 5-67). 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 IPAA) 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 EDN/EPX при активност и ремисия корелират и следват тези на ФКП, като всичките отразяват добра зависимост спрямо здравите контроли ($p < 0.05$) (Таблица 5-67). 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 ($p = 0.163$).

езависим 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 5-67. Independent Samples t-Test между IR-CD в ремисия и здрави контроли за EDN/EPX

5.7.4 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 5-68**).

Корелация между CDAI и EDN/EPX			
		CAI	Fecal EDN/EPX (ng/ml)
CAI	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 5-68. Корелационна зависимост между EDN/EPX и CDAI при оперирани БК болни (ремисия и активност).			

6. 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 неинвазивни (биомаркери). Ендоскопските изследвания са съществен елемент за поставяне на диагнозата и хистологична верификация, но част от пациентите могат да бъдат диагностицирани чрез неинвазивни 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 неинвазивни 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 FGF 19, EDN/EPX и ФКП, като биомаркери при това заболяване.

МК се смята от някои автори за нов член на групата хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЗЧ, 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 ХВЗЧ 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 г. \pm 17 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. \pm 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 $221\mu\text{g/g}$ (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 патоанатома 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 FGF 19 от $\leq 30.04\text{ pg/mL}$ 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 9 мг/.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 10 мг.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 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 $<136 \text{ pg/mL}$ (други автори използват cut-off от $<145 \text{ pg/ml}$). 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 кофактор 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 СГ 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 х (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 проинфламаторни 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 х (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 $\mu\text{g/g}$ 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 (TFFBA) 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 ± 85.55 pg/mL, и $FGF19 \leq 114.07$ 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 - кофактор 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 релапсирани 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 увеличения 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 ИРАА)

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 неинвазивни 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 ИРАА) 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 ≤ 32.88 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-pouch 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 ИРАА. 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 $n=9/9$ $FGF19 \leq 136,07 \text{ pg/mL.}$ и средните стойности на FGF19 в групата са $12.145 \pm 112.11 \text{ pg/mL.}$ 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 $FGF19 \leq 98.01 \text{ pg/mL.}$, като средните стойности са $24.58 \pm 20 \text{ pg/mL.}$, 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 $<10\text{cm.}$ 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 не-инвазивни 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 еозинофили 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.

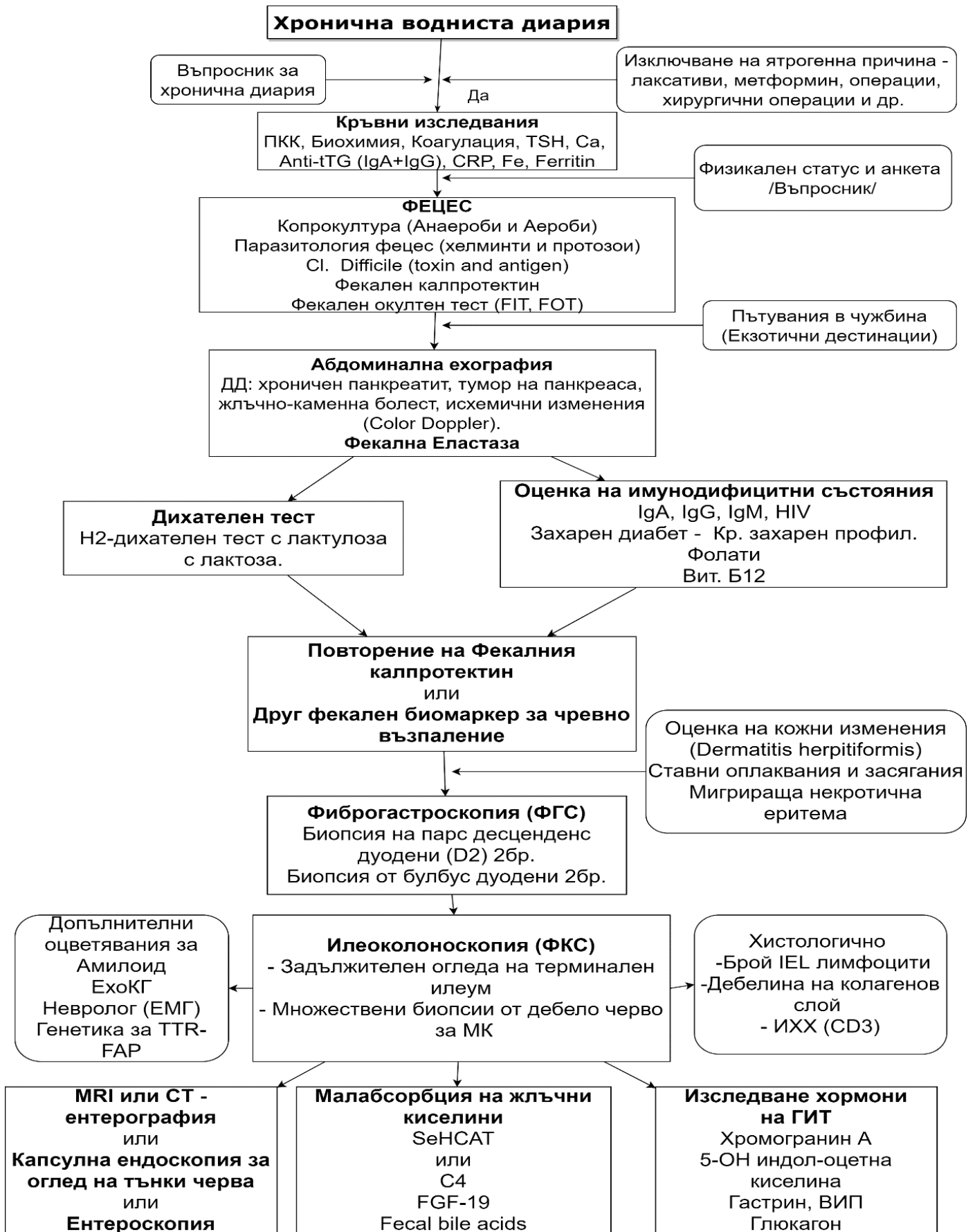
7. ИЗВОДИ

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.

8. 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 практически характер.*
3. Представена е клиничната значимост и диагностичната точност на серумния FGF-19 като неинвазивен 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 научнопрактически 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.*

9. СТРАТЕГИЯ И ПОДХОД ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНА ВОДНИСТА ДИАРИЯ



Фигура 17. Диагностичен алгоритъм и подход при пациенти с хронична водниста диария

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

10.1 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“ – 2018 г. (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, 2019 г. 55-65

10.2 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 compared 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 fecal 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 abstracts* 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).

10.3 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., Кьосева 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., Кьосева 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., Кьосева Д., Пенчев П., Владимирова Б. Едно подценявано заболяване: Микроскопски колит. Национален конгрес по Патология, Велинград, България 2019 (орална презентация)

11. 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

