



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

Катедра “Обща медицина и клинична лаборатория”

Д-р Марияна Георгиева Йорданова

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

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

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

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

Научен ръководител: доц. д-р Даниела Иванова Герова, д. м.
Научен консултант : проф. Маргаритка Бончева, д.м.

Варна, 2021

СЪДЪРЖАНИЕ

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1. Общ преглед на гастроинтестиналните заболявания	9
2. Лабораторна диагностика на стомашно-чревните заболявания	12
3. Слюнката като перспективна биологична матрица, предоставяща допълнителна информация за патологичните процеси в ГИТ.....	17
3.1. Образуване и функции на слюнката	18
3.2. Състав на слюнката.....	21
3.3. Клетъчен състав на слюнката	26
3.4. Защитна роля на слюнка.....	30
3.5. Оксидативен стрес и антиоксидантна защита на слюнката.....	32
3.6. Фактори, променящи състава и защитната способност на слюнката	37
4. Приложение на слюнката в съвременния диагностичен процес	38
5. Преданалитични правила за събиране, обработка и съхранение на биологичен материал	46
6. Изводи от литературния обзор.....	48
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	50
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	52
1. Изследвани лица:.....	52
2. Биологични материали	54
3. Методи на изследване.....	55
3.1. Изследване на лабораторни показатели във венозна кръв.....	55
3.2. Изследване на лабораторни показатели в слюнка	57
3.3. Изследване на лабораторни показатели във фецес.....	60
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	62
1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на избрани биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка.....	62
1.1. Разработване правила за събиране, обработка и съхранение на орална течност, съобразени с преданалитичните изисквания.	62
1.2. Оптимизиране и валидиране на методи за изследване на някои от биохимичните показатели в слюнка.....	63
1.1.1. Валидиране на d-ROMs тест – метод за определяне ROS.....	63
1.1.2. Валидиране на SAT тест – метод за определяне на антиоксидантния капацитет на слюнката.....	66
1.1.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин IgA.....	70

1.1.4. Валидиране на метод за изследване на нитрити в слюнка.....	71
2. Проучване на биологичните вариации на подбрани биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтния им интервал.....	75
2.1. Влияние на пол и възраст.....	75
2.2. Влияние на тютюнопушенето.....	82
2.3. Референтни граници	87
3. Проучване на биологичната вариация и определяне на референтния интервал на маркери, оценяващи оксидативния стрес в слюнка и серум от здрави лица.....	96
3.1. Влияние на пол и възраст върху показателите за ОС в слюнка	97
3.2. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в слюнка.....	98
3.3. Влияние на пол и възраст върху показателите на ОС в <i>серум</i>	99
3.4. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в <i>серум</i>	101
3.5. Определяне на референтни граници на показателите на ОС в слюнка и серум.....	102
3.5.1. Показатели на ОС в <i>слюнка</i>	102
3.5.2. Показатели на ОС в <i>серум</i>	103
4. Проучване на корелативни връзки между изследваните слюнчени и серумни показатели.....	105
5. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични заболявания на горния ГИТ.....	109
5.1. Характеристика на пациентите с хронични гастрити.....	109
5.2. Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при хронични гастрити и установяване на корелационни зависимости между тях	111
5.3. Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с хронични гастрити.....	125
5.4. Резултати и обсъждане от изследването на серумни показатели за оксидативен стрес при пациенти с хронични гастрити	130
5.5. Корелационни зависимости между ендоскопските промени в стомаха и изследваните параметри в слюнка и серум Изследване на серумни нива на CRP и желязо при пациентите с хронични гастрити.....	134
5.6. Диагностичен потенциал на изследваните слюнчени и серумни параметри при хроничните гастрити.....	141
5.7. Заключение.....	144
6. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания.....	145
6.1. Характеристика на пациентите с ХВЧЗ.....	146
6.2. Резултати и обсъждане от изследването на избраните слюнчени и серумни параметри при ХВЧЗ и оценка на диагностичния им потенциал	147

6.3. Резултати и обсъждане от изследването на клетъчния състав на слюнката при пациенти с ХВЧЗ.....	160
6.4. Резултати и обсъждане от изследването на слюнчени и серумни нива на ROS и антиоксидантен капацитет при пациенти с ХВЧЗ, корелационни взаимосвързки с активността на заболяването и оценка на диагностичния им потенциал	163
7. Значение, корелационни взаимосвързки с активността на заболяването и диагностичен потенциал на нови биомаркери: фекален калпротектин и серумна аденозиндезаминаза за диагностиката и мониториране на пациенти с ХВЧЗ и сравнение с утвърдените маркери на възпаление.....	174
VI. ИЗВОДИ.....	187
VII. ПРИНОСИ	189
VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	190
IX. БИБЛИОГРАФИЯ.....	192

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

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

На латиница

ADA	–	adenosine deaminase
ALB	–	albumin
АОС	–	antioxidant capacity
ASAT	–	aspartate transaminase
ВАР	–	biological antioxidant potential
С3	–	C3 complement
DNA	–	deoxyribonucleic acid
dROMs	–	reactive oxygen metabolites
ЕС	–	epithelial cells
FC	–	fecal calprotectin
GSHP	–	glutathione peroxidase
IBS	–	irritable bowel syndrome
IFCC	–	International Federation of Clinical Chemistry
IgG	–	immunoglobulin G
IBD	–	inflammatory Bowel Disease
HP	–	Helicobacter pylori
LDH	–	lactate dehydrogenase
Lfer	–	lactoferrin
NO	–	nitrogen oxide

NOS	–	nitric oxide synthase
RBC	–	red blood cells
RNS	–	reactive nitrogen species
ROS	–	reactive oxygen species
RNA	–	Ribonucleic acid
sAA	–	salivary alpha-amylase
SAT	–	salivary antioxidant test
sIgA	–	secretory immunoglobulin A
SOD	–	superoxide dismutase
TAC	–	total antioxidant capacity
TP	–	total protein
UA	–	uric acid
WBC	–	white blood cells
FRAP	–	ferric reducing antioxidant power
TBARS	–	thiobarbituric acid reactive substances

I. ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

добиване на тези биологични материали е щадящо и приемливо за пациентите като алтернатива за избягване на честите, неприятни и рискови манипулации като гастрокOLONоскопии и биопсии при проследяване хода на хроничните заболявания на ГИТ.

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

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Общ преглед на гастроинтестиналните заболявания

Стомашно-чревните заболявания са сериозен проблем за съвременния човек. Стресът и забързаният ритъм на живот, нарушенията в хранителния режим с гладуване или преяждане и редица вредни привички (тютюнопушене и алкохол) водят до различни гастроинтестинални смущения, характеризиращи се със следната симптоматика – лошо храносмилане, гадене и повръщане, диария, запек и свързана с тях болка в областта на корема. Заболяванията на гастро-интестиналния тракт (ГИТ) обикновено протичат скрито и незабележимо, а когато има изразена симптоматика, се установява напреднал стадий. Ранната диагностика намалява риска от усложнения и увеличава шанса за благоприятен изход от заболяването. Така цел на съвременната медицина е използването на достъпни, чувствителни и специфични биомаркери, получени по неинвазивен начин, с помощта на които да се подсигури своевременна и ранна диагностика.

Гастро-интестиналният тракт (ГИТ) се простира от устната кухина до ануса. Той се разделя на горен и долен отдел. Горният отдел обхваща уста, хранопровод, стомах и дванадесетопръстник. Най-честите заболявания, засягащи тази част на стомашно-чревния тракт, са гастритите, дуоденалната и стомашна язва. В световен мащаб хроничните гастрити и язвената болест са често срещани заболявания. Установена е нарастваща заболеваемост с напредване на възрастта. Това се дължи не само на нарушения в хранителния режим, хроничния стрес и редица вредни навици, но и на неконтролната употреба на множество медикаменти, на лоша устна хигиена и контаминация с *Helicobacter pylori* (HP), доказал своята етиологична роля в язвената болест.

Гастритът се характеризира с хроничен неспецифичен възпалителен процес на стомашната лигавица от дифузен и огнищен характер, постепенно водещ до атрофия. Важни действащи ендогенни фактори са нарушена функция на централната и вегетативната нервната система и стресови състояния, водещи не само до секреторни и моторни промени в стомаха, но и до трофични нарушения на стомашната лигавица. В клиничната практика значението на хроничния гастрит като сериозно заболяване е до голяма степен подценено, въпреки очевидната му роля в патогенезата на пептичната язва и рака на стомаха (Sirponen and Maaroos, 2015). Хроничният гастрит се дели на няколко типа. Смята се, че тип А се развива по автоимунни механизми. Тип В гастритът засяга

антрума на стомаха и в над 85% от случаите е вследствие на инфекция с НР. Заразяването с този микроорганизъм е широко разпространено и се осъществява по фекално-орален механизъм (през устата от замърсени ръце и предмети) и по орално-орален (чрез устен контакт). Съществува и гастрит тип С, който се предизвиква от химични въздействия – НСПВС и агресивно въздействие на жлъчката при рефлукс към стомаха. Хроничните гастрити се приемат като болест на цивилизацията. Понякога пациентите дотогава привикват към симптомите, че не търсят навременната лекарска помощ.

През последните 15 – 20 години се наблюдава значително по-ниска честота на язвената болест в сравнение с все по-често срещаните се хронични гастрити. На практика приблизително при 50% от хората след 50-годишна възраст е налице хроничен гастрит, но едва около 15% от тях развиват пептична язва. Дуоденалната язва се среща почти 4 пъти по-често от стомашната и преобладава във възрастта от 30 до 50 години. Язвеният дефект е резултат от пептичното действие на киселия стомашен сок и увреждането по различни механизми на защитните свойства на лигавичната бариера.

НР е спираловиден грам-отрицателен организъм, адаптиран да се развива в кисела среда. Имплантира се главно в антралната част и по-рядко в корпуса на стомаха. Под въздействие на микроорганизма и отделените от него цитотоксини и муколитични ензими настъпват възпалителни изменения на стомашната лигавица. Тя се инфилтрира с лимфоцити, плазмоцити и неутрофилни гранулоцити. Степента на колонизация с микроорганизма определя тежестта на заболяването, а степента на инфилтрация с неутрофили – активността му. НР секретира ензима уреаза, който разгражда уреята от мукуса и образува около него алкална защитна зона, предпазваща го от силно киселия стомашен сок. Развива се и последваща атрофия на жлезния апарат на стомаха, при което количеството на секреторните жлези намалява. Увреждането на защитната стомашна мукозна бариера с трите ѝ елемента (преепителен, епителен и субмукозен), която възпрепятства обратната дифузия на водородните йони (H^+) от лумена на стомаха в мукозата, е важен фактор в патогенезата на язвената болест. През 1994 г. НР е признат за карциноген от 1-ви клас. Затова усилията са насочени към ранна и сигурна диагностика на инфекцията с НР и адекватно успешно лечение на асоциираната значима гастродуоденална патология.

Долният отдел на ГИТ включва йеюnum, илеум и дебело черво. Най-чести заболявания, засягащи този отдел са хроничните възпалителните чревни заболявания (ХВЧЗ). Те включват основно болестта на Крон (БК) и улцерозния колит (УК), две

социално значими заболявания, засягащи предимно млади хора и такива в активна творческа възраст. Честотата на ХВЧЗ нараства непрекъснато. В световен мащаб БК засяга средно 50 на 100 000 души население, а УК между 40 до 100 болни на 100 000 души от общата популация (M'Koma, 2013; Ye et al., 2015). По-голяма е честотата в Северозападна Европа, а по-малка е на юг. Според Световната здравна организация броят на болните в България се е увеличил пет пъти за 66 години (от 1950 до 2016 г.). В момента те са около 21 000 души, но голяма част от хората не се лекуват или са с погрешно поставена диагноза. Според данни от 2017 г. от БК се лекуват едва 1100 души в България, а от УК – 2515. Болестта на Крон се открива трудно, често с 2 до 3 години закъснение (конференция по проект IBD-Ahead, 2018).

Етиологията и патогенезата на заболяванията остават неясни и недостатъчно проучени. Предполага се взаимодействие между генетична предразположеност, фактори на околната среда (тютюнопушене, диета, инфекции) и чревна микрофлора, което води до неконтролиран имунен отговор, протичащ с увреждане на лигавицата. Важна роля в патогенезата играе инфилтрацията на засегнатите участъци с полиморфонуклеарни неутрофили и мононуклеарни клетки, което води до активиране на имунна каскада. Действащи възпалителни фактори в тази каскада са: Тумор некрозис фактор- алфа (TNF- α), Интерлевкин - 1 (IL-1), Интерлевкин - 6 (IL-6), Интерлевкин - 8 (IL-8), Интерлевкин - 12 (IL-12), Интерферон - гама (INF- γ). Възпалението е тясно свързано с образуването на високо реактивни съединения, включително реактивни кислородни форми (ROS - reactive oxygen species) и реактивни азотни форми (RNS – reactive nitrogen species). Активираните неутрофили отделят цитотоксични вещества, които причиняват инфламаторно и деструктивно увреждане на тъканите. Индуцируемата азотен оксид синтетаза (iNOS) се открива само във възпалената тъкан и е отговорна за прекомерно генериране на RNS (Dijkstra et al., 1998; Piechota et al., 2014). Повишените крайни продукти – азотен оксид (NO), простагландин E2 и левкотриен B4, допринасят за увреждане на чревната мукоза и редуциране активността на антиоксидантната система (Sklyarov et al., 2011; Valmus et al., 2016).

И двете заболявания се характеризират с хроничен рецидивиращ ход с различна продължителност и интензитет, а също с наличие на чревни усложнения (диария със слуз и/или кръв, коремна болка, перианални фистули, обструкция на червата) и извънintestinalни прояви (орални промени, увеит, артрит и др.). Докато УК е ограничен до лигавицата на дебелото черво, БК може да засегне всеки сегмент на

стомашно-чревния тракт от устата до ануса и се характеризира с фокално, асиметрично, трансмурално и понякога с грануломатозно възпаление.

2. Лабораторна диагностика на стомашно-чревните заболявания

Хроничното възпаление на лигавицата на ГИТ води до трайни морфологични промени. Ето защо поставянето на диагнозата почива най-вече на обективизиране на промените в лигавицата с инвазивно ендоскопско изследване. При много пациенти, поради страх от тази процедура, диагностицирането се отлага максимално дълго време. Използването на неинвазивни диагностични методи може да доведе до значително скъсяване на този период, респективно по-ранно лечение и предотвратяване на редица усложнения.

Тъй като основен етиологичен фактор за заболяванията на горен отдел на гастроинтестиналния тракт е НР, основните диагностични методи са насочени към доказване наличието на този микроорганизъм. Диагностика на инфекцията с НР отбелязва значителен успех през последните две десетилетия. Съществуват инвазивни и неинвазивни методи за откриване на контаминацията с НР. Инвазивните методи почиват на ендоскопско изследване и вземане на биопсичен материал с последващо микробиологично или хистологично изследване, докато неинвазивните се използват за установяване наличие на специфични бактериални антигени във фецес и провеждане на дихателен (уреазен) тест. Налице са и различни серологични тестове (качествени и количествени) за откриване на антитела срещу НР. Обстоятелството, че антителата могат да присъстват в серума в продължение на няколко години, дори и след елиминиране на инфекцията, ограничава информативната стойност на теста по отношение носителство или реинфекция.

Тъй-като етиологията и патогенезата на ХВЧЗ остават все още неясни, на този етап няма специфични лабораторни тестове за тези заболявания. В практиката широко се използват неспецифичните възпалителни маркери като скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ), фибриноген, CRP (C-reactive protein). Тези показатели изразяват възпалението и метаболитните промени на целия организъм в периодите на рецидив и отразяват в по-малка степен локалната тежест на възпалителния процес в стомаха и червата. Проследяват се и редица хематологични показатели като хемоглобин, хематокрит, брой на еритроцити, левкоцити и тромбоцити, както и на серумните желязо и витамин В12, (напр. при засягане на терминалния илеум), които се променят поради хроничното възпаление и кръвозагуба. CRP е чувствителен белтък на острата фаза, който

се синтезира в черния дроб. Повишава се при възпалителни, бактериални, вирусни и некротични процеси в организма. Възпалителни медиатори като IL-1 β , TNF- α и особено IL-6 индуцират синтезата му. Но самостоятелното му използване при поставяне на диагнозата и мониториране на БК и УК е неподходящо. Приблизително 30% от хората не експресират CRP поради генетичен полиморфизъм и липса на адекватен отговор (Norouzinia et al., 2017). Има и значителна хетерогенност в CRP-отговора при двата типа заболявания, като е по-слаб при пациенти с УК. СУЕ е другият широко използван възпалителен маркер. Той е нединамичен показател (увеличава се и нормализира по-бавно в хода на възпалителната реакция) и има ниска чувствителност, което го прави не особено подходящ мониториране на клиничното състояние и оценяване на терапевтичния ефект. Установено е, че СУЕ корелира по-добре с активността на възпалителния процес, когато е локализиран в дебело черво и в много по-малка степен – когато е локализиран в тънките черва (Vermeire et al., 2006; Chang et al., 2015).

Имунно-медираната природа на ХВЧЗ определя и наличието на няколко вида антитела в серумите на пациентите. Счита се, че антинеутрофилните цитоплазмени антитела (pANCA) се предизвикват от кръстосана реактивност с чревни бактериални антигени. Установено е, че pANCA се откриват в 60% – 70% от случаите на УК и само в около 10% – 15% от случаите на БК. Обратно, антителата против дрождите *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA – антигликанови антитела срещу манан на повърхността на клетъчната стена) се откриват основно при пациенти с БК. Неслучайно при едно проспективно проучване с неклассифицирани случаи на ХВЧЗ се открива, че 64% от пациентите с УК са били ASCA отрицателни и pANCA положителни (Norouzinia et al., 2017). Въпреки че тези два типа антитела имат добра специфичност и допринасят за дискриминацията на БК от УК, те нямат висока чувствителност за диагнозата. Това ограничава тяхното приложение за скрининг и не допринасят за определяне на клиничната активност или ремисия на заболяването (Norouzinia et al., 2017).

Провъзпалителните цитокини играят критична роля в имунния отговор при ХВЧЗ, но тяхното използване за оценка на активността на заболяването е също ограничено – често техните серумни нива остават в референтни граници, независимо от активността на процеса (Korolkova et al., 2016).

Нов маркер, сочещ имуно-медиация механизъм на редица заболявания е ензимът аденозин дезаминаза (ADA), участващ в диференциацията и функционалната активност на различни видове имунни клетки. ADA е пуринов катаболен ензим, който катализира

необратимата конверсия на аденозин и дезоксиаденозин в инозин и дезоксиинозин. Представлява малък (40 kDa) мономерен ензим, състоящ се от 363 аминокиселини. Досега са идентифицирани три изоформи на ензима с уникални биохимични свойства: ADA1, ADA2 и ADA3. Изоензимът ADA1 е широко разпространен в организма, като най-висока активност се открива в лимфоцитите и моноцитите (Azimi et al., 2017). ADA1 съществува в два молекулни варианта, форма с ниско молекулно тегло или с високо молекулно тегло в комплекс с ADA-свързващия протеин CD26. Взаимодействието между ADA и CD26, експресирано върху Т-лимфоцитите, води до тяхната пролиферация, диференциация и съзряване (Larijani, 2016). Изоформата ADA2 (114 kDa хомодимер, кодиран от CECRI гена) основно е локализирана в извънклетъчното пространство и преобладава в серума на нормалните индивиди. Основният ѝ източник вероятно е моноцитно-макрофагеалната система, синтезираща я в отговор на патогенни фактори. В сравнение с ADA1, която има еднакъв афинитет към аденозин и 2'-дезоксиаденозин, ADA2 проявява много по-висок афинитет към аденозин (Skarar et al., 2014). ADA2 се причислява към новото семейство от фактори на растежа, наречени ADCF (ADA-свързани фактори на растежа). ADA2 се увеличава силно при възпалителни заболявания като ревматоиден артрит, туберкулоза, СПИН и диабет. Наскоро е открита ADA3 изоформа или ADA-подобен протеин (ADAL), все още с неизяснена функция (Antonioli et al., 2012).

Основната функция на ADA се проявява в лимфоидната тъкан, където тя е от съществено значение за диференциацията и функционалната активност на различни видове имунни клетки – лимфоцити, макрофаги, неутрофили и дендритни клетки. Активността на езима е по-висока в Т-лимфоцитите, отколкото в В-клетъчната популация. Разлика в активността на ADA се установява по време на диференциация на Т-клетките, като е по-активна в незрелите Т-клетки (Skarar et al., 2014; Ebrahimi-Rad et al., 2018). Има данни, че ADA участва в регулацията на моноцитната диференциация и превръщането им в макрофаги, както и в модулирането на техните функции. Като основен източник на извънклетъчната ADA моноцитно-макрофагеалната система засяга функцията и на други имунни клетки. Неутрофилната функция зависи от ADA, която стимулира генерирането на реактивни кислородни форми (Kälvegren et al., 2010). Висока активност на ADA се наблюдава и в дендритните клетки, което улеснява имунната активация и хиперреактивността по време на възпаление (Khodadadi et al., 2014). Така ADA повлиява клетъчната имунна активност и участва в патофизиологията на различни

хронични възпалителни заболявания. Досега са натрупани данни за ролята на ензима и повишаване на нивата му при хронични белодробни заболявания, туберкулоза, лейшманиоза, автоимунни заболявания, ХВЧЗ, невродегенеративни заболявания, сепсис, лимфоми, цироза, остър хепатит, ХИВ и други (Khodadadi et al., 2014; Azimi et al., 2017). Все още ролята на ADA в патофизиологията на ХВЧЗ не е достатъчно проучена.

Имунните клетки в ГИТ са основен източник за генериране на ROS и RNS, отговорни за неспецифичната защита на организма. Има данни, че те увеличават експресията на гени, участващи във вродения и адаптивния имуен отговор в ГИТ. RONS са силно реактивни молекули, поради наличие на несдвоени валентни електрони или поради лабилни химични връзки в структурата им, и са отговорни за окисление и увреда на макромолекули като въглехидрати, протеини, липиди и нуклеинови киселини. Патологичният имуен отговор с натрупване на инфламаторни клетки в мукозата, хронично възпаление, нарушената тъканна перфузия с увреждане на лигавиците, водят до повишено производство на RONS. За да се справят с увеличената им концентрация при възпалителен процес, чревните клетки притежават механизми за елиминирането им чрез няколко ензимни и неензимни антиоксидантни системи. Оксидативният стрес е резултат от нарушен баланс между двата процеса – генериране на реактивни форми и тяхното елиминиране. Понастоящем са натрупани все повече факти, че оксидативният стрес се явява потенциален патогенетичен фактор за инициране и прогресия на ХВЧЗ (Tian et al., 2017).

Лабораторното определяне на всички реактивоспособни молекули, участващи при възникването на оксидативния стрес е трудоемка, скъпа и понякога невъзможна дейност (напр. поради свръх краткото време на полуживот на някои радикали) (Griendling et al., 2016). Затова най-често се определят маркери на общия оксидативен капацитет, чрез установяване на пероксидирани метаболити на липиди или протеини, както и на антиоксидантния капацитет на плазмата. Изследването на тези параметри при пациенти със заболявания на ГИТ, би могло да даде добра представа за нарушения баланс между оксиданти/антиоксиданти и степента на оксидативния стрес. iNOS се счита за отговорна за силно увеличената продукция на NO в епитела на възпалената чревна лигавица с потенциал за образуване на токсичния нитротирозин, считан от някои за канцероген (Pacher et al., 2007; Calcerrada et al., 2011). Установява се и порочен кръг, тъй като продуцираният NO стимулира и секрецията на TNF- α , което увеличава инфилтрацията на неутрофили в чревната мукоза (Yasukawa et al., 2012).

Обикновено лабораторните биомаркери се определят в биологични материали, взети по неинвазивен или минимално инвазивен начин, по-лесни са за изпълнение и са сравнително евтини (Fengming and Jianbing, 2014). Идеалният биомаркер трябва да притежава специфичност и добре да разграничава ХВЧЗ от функционални нарушения на чревния тракт. С негова помощ трябва да може обективно да се оцени активността на заболяването, да се прогнозира хода му (рецидив или усложнение) и да служи за мониторинг на терапията (Viennois et al., 2015). За съжаление, все още няма такъв маркер, който да покрие всички тези изисквания. Използваните рутинни лабораторни маркери не винаги корелират със съществуващите ендоскопски лезии (Solem et al., 2005; Mendoza and Abreu, 2009). Налага се те да се комбинират с клинични показатели (брой дефекации на течни фекалии, хематохезия, коремна болка, общо състояние, наличие на екстраинтестинално усложнение като артрит, ирит, увеит, еритема нодозум, пиодерма гангренозум, афтозен стоматит, анална фисура или фистула, периректален абсцес, повишена температура над 38°C, опипваща се коремна формация, телесна маса). С помощта на комбинация от лабораторни и клинични показатели се определя степента на активност на заболяването чрез изчисляване на различни индекси, като за БК най-често се определя CDAI (Crohn's Disease Activity Index), а за УК – т. нар. Mayo индекс. Все още за диагностиката и мониторирането на хода на ХВЧЗ, като златен стандарт остават инвазивните ендоскопски процедури с вземане на биопсичен материал и поставяне на хистологична оценка.

В последното десетилетие в лабораторната практика се наложи нов показател – калпротектин (СР), с чиято помощ е възможно да се оценяват възпалителни процеси в организма. СР принадлежи към семейството на S-100 протеините и представлява около 60% от общия протеин в цитозола на неутрофилни гранулоцити и в по-малки количества в моноцити и активирани макрофаги. Синтезът му се индуцира от различни фактори на възпалението – липополизахариди, IL-6, IL-1b, C5a, TNF- α (Isaksen and Fagerhol, 2001). Състои се от една лека и две тежки полипептидни вериги, с молекулно тегло 36.5 kDa. Всяка субединица на хетеротримера има способност да свързва два калциеви и два цинкови йона. Проявява силно бактерицидно и микостатично действие (Benet Dhas et al., 2012), осъществява и антипролиферативни ефекти посредством хелатиране на цинкови катиони, като така инхибира матриксните металопроотеинази и запуска апоптозната каскада. СР играе съществена роля в патофизиологията на възпалението. Освобождавайки се от клетките по време на неутрофилното активиране и моноцитната

адхезия, той може да се открие в различни биологични течности като плазма, слюнка, урина, цереброспинална течност и изпражнения (Mumolo et al., 2018).

Фекалният калпротектин (FC) се наложи като нов лабораторен параметър при възпалителните заболявания на чревния тракт. Той в значителна степен покрива представите ни за идеален биомаркер. Като отразяващ директно инфилтрацията на чревната мукоза с неутрофили и мононуклеарни клетки, дава възможност за оценка на възпалението, определяне активността на заболяването и неговото мониториране, както и ефективността от лечението (Carpello and Morreale, 2016). При пациенти с ХВЧЗ е установено, че FC се увеличава над 100 пъти, като пряка последица от дегранулацията на неутрофилите в увредената възпалена лигавица и добре корелира с ендоскопската находка и хистологичната оценка на активността на заболяването (D'Angelo et al., 2017). Фекалният калпротектин е един от най-чувствителните неинвазивни маркери за разграничаване на ХВЧЗ от функционалните разстройства като синдрома на дразнимото черво (Irritable bowel syndrome - IBS). Така в множество репрезентативни изследвания се доказва, че FC може да се използва успешно за мониториране хода на ХВЧЗ, проявявайки по-голяма прогностична стойност за риск от рецидив в сравнение с общоприетите CRP и СУЕ (Bahgat and Etreby, 2017). Стои под въпрос все още употребата на серумния калпротектин (sCP) при ХВЧЗ. В няколко проучвания sCP се посочва също като надежден биомаркер, откривайки добра корелация между серумните нива на калпротектин и тежестта на заболяването, прогнозата и рецидивите (Azramezani et al., 2019). Но все още в литературата няма консенсус по отношение на клиничната му употреба.

3. Слюнката като переспективна биологична матрица, предоставяща допълнителна информация за патологичните процеси в ГИТ

Цел на съвременната медицина е търсене и намиране на неинвазивни маркери, чрез които с висока специфичност и сензитивност да могат рано да се идентифицират пациенти със хронично протичащи заболявания на ГИТ и да се намали броя на ненужните инвазивни ендоскопски процедури.

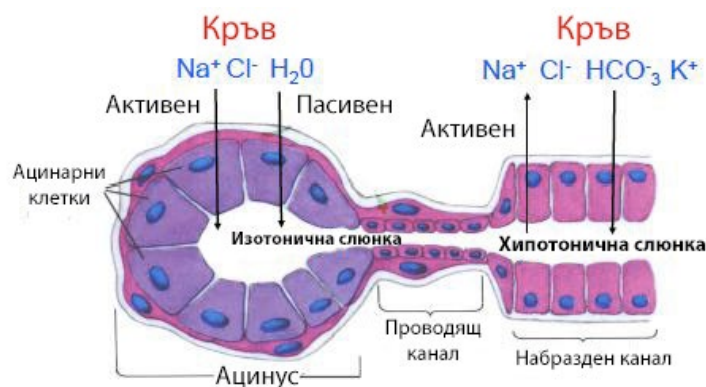
Оралната течност (слюнка) отдавна привлича вниманието на специалистите относно възможността да се използва като заместител на рутинно използваните кръвни проби и/или други телесни течности за диагноза и мониториране състоянието на здраве и болест. Лесното неинвазивно получаване на слюнка чрез достъпна, необременяваща,

безболезнена и безопасна за изследваните лица процедура я прави все по-предпочитан биологичен материал. Изследването на различни биохимични показатели и маркери в оралната течност (ОТ) би позволило да се избегнат неприятни и рискови за пациента манипулации, каквито са вземане на кръв, гастроскопия, биопсия и др., особено при проследяване хода на вече диагностицирани заболявания и установяване на релапс или ремисия. Тези предимства имат значение при невъзможност за вземане на кръвна проба, особено в педиатрията, при провеждане на биологичен или на терапевтичен мониторинг, както и при скринингови проучвания на епидемиологично-значими заболявания.

3.1. Образуване и функции на слюнката

Слюнката е основният компонент на оралната течност (сборен вискозен секрет, отделян в устната кухина). Представлява сложен биофлуид, който се явява огледало на функционалното, метаболитното, хормоналното и емоционалното състояние на организма (Greabu et al., 2009). Съдържа разнообразие от нискомолекулни вещества, ензими, хормони, антитела, антимикробни съставки и растежни фактори (Humphrey and Williamson, 2001; Malamud, 2011). Една част от тях се синтезират локално от слюнчените жлези, а други се пренасят от кръвта, чрез процеси на пасивна дифузия, активен транспорт или извънклетъчна ултрафилтрация (Lee and Wong, 2009). Слюнката се отделя от големи и малки слюнчени жлези (*glandulae salivariae oris*), от които с най-голямо значение са три основни двойки – *glandula parotis*, *glandula submandibularis* и *glandula sublingualis*.

Слюноотделянето е непрекъснат и активен процес, протичащ в две фази. Ацинарните клетки на слюнчените жлези секретират течност, съдържаща вода, електролити, муцини, имуноглобулини, ензими и други. Така образуваната първичната слюнка по състав е много близка до плазмата (Humphrey and Williamson, 2001; Punj, 2018). Секретът навлиза в система от набраздени канали, покрити с цилиндрични клетки, където търпи модификация. Извършват се процеси на реабсорбция на натриеви и хлорни йони и се секретират калиеви и бикарбонатни йони. Формираната вторична слюнка (Островский et al., 2010, Iorgulescu, 2009), е хипотонична (отн. тегло $1.002 \div 1.006$), с леко кисела към неутрална реакция ($pH = 6.0 \div 7.0$) (de Almeida Pdel et al., 2008). Механизмът на образуване на слюнката е илюстриран на фигура 1.



Фиг. 1. Механизъм на образуване на слюнката (Porcheri and Mitsiadis, 2019)

Общият обем на отделената слюнка за едно денонощие варира в границите от 0.75 L до 1.0 L (по някои данни до 1.5 L) (de Almeida Pdel, 2008; Островский et al., 2010,), средната скорост на потока е от 0 до 5 mL/min, като по време на сън достига минимума (под 0.1 ml/min). Секрецията и модифицирането на слюнката се регулира от автономната нервна система, търпи циркадни вариации и зависи от различни стимули – мирис, вкус, болка, хранене, емоционално състояние, рецепторни въздействия на ниво вегетативна нервна система (Nater et al., 2006; Alhajj and Babos 2020). Храненето и апетитът, както и психическото възприятие на храната са мощен и постоянен стимул, поради което И. Павлов нарича слюнката „сок на апетита“ и са с важно физиологично значение. Има доказателства, че вкусовото усещане може да се модулира от слюнчени пептиди при взаимодействието им със съответни рецептори, експресирани върху клетъчната мембрана на редица клетки в устната кухина, например езичните вкусово-рецепторни клетки. Понастоящем някои от слюнчените пептиди се обозначават като метаболитни хормони. Доказана е тяхната роля не само във вкусовото възприятие, но и като модулатори на телесното тегло и енергийната хомеостаза на организма (Zolotukhin, 2013). Произходът им е различен – от слюнчени жлези, гингивална течност и трансудат от плазмата или от вкусовите рецепторни клетки. Те изпълняват ендокринна или паракринна роля в зависимост от това дали произходът им е системен или локален. Метаболитни хормони с важно значение са инсулин, глюкагон, лептин, адипонектин, глюкагон свързан пептид-1 (GLP-1), грелин, стомашен инхибиторен полипептид (GIP), холецистокинин (ССК), вазоактивен интестинален пептид (VIP), обестатин и други. Днес, когато метаболитният синдром и затлъстяването добиват епидемични размери, търсенето на методи, с които да се модулира нивото на тези слюнчени пептиди, а оттам и вкуса към определени калорични и вредни храни, се явява модерен подход в борбата с наднорменото тегло.

Активирането на парасимпатиковата нервна система стимулира притока на кръв към жлезите и води до отделяне на големи количества водниста слюнка (богата на йони и ензими). Обратно, при стимулация на симпатикуса се произвеждат малки количества слюнка, съдържаща повече протеини (Chiappin et al., 2007). Когато съдържанието на вода в организма намалее с 8÷10%, слюнченият поток стига почти до нула. Приемът на храна и нейният характер, биоритмите, плазменият състав на кръвта, хормоналният статус, болестни нарушения на слюнните жлези и системни заболявания оказват влияние върху скоростта на секреция. Съществуват противоречиви данни за саливарните вариации относно тази скорост в зависимост от възрастта и пола. Вариациите в слюнчената секреция между двата пола се обясняват с по-малкия обем жлезиста тъкан и влияние на половите хормони в посока намаляване на секрецията при жените (Fenoll-Palomares et al., 2004). Известно е, че с напредване на възрастта започва постепенна загуба на паренхимна тъкан в слюнчените жлези и заместване на ацинарните с мастни клетки (Scott and Path, 2006; Xu F et al., 2019).

Намаленият обем на слюнката в устната кухина води до изсушаване на оралната мукоза и загуба на защитните ѝ ефекти. Повечето орални инфекции (кандидоза, орален лихен планус, синдром на пареща устата, повтарящи се афтозни язви, зъбен кариес), трудности при говора, храненето и преглъщането, а също и промяна във вкуса при възрастни пациенти, се дължат на хипосекреция (ксеростомия), причинена от различни локални или системни заболявания, както и от употреба на редица лекарства. Слюнченият дебит и буферният капацитет, поддържан от три буферни системи (въглеродна киселина, бикарбонат, фосфат и протеини) са важни характеристики, изучени обстойно при стоматологични и общи заболявания (уремия, захарен диабет, обезводняване, климакс, болест на Съогрен). Промените в техните стойности оказват кариогенно или провъзпалително въздействие.

Слюнката има многостранни функции. Муцинозните вещества в нея участват в образуването на хранителен хлъзгав болус, който лесно преминава през хранопровода. Слюнката разтваря сухата храна и осигурява среда за действието на намиращите се в нея ензими, иницира разграждането на въглехидратите. Подпомага речта и артикулацията. Оралната течност осигурява добра хигиена на устната кухина, като я промива и отмива остатъците от храна. Поддържа в равновесие калциевите катиони в емайла и пречи на преципитацията им. Наличните в слюнката антибактериални ензими лизозим, лактоферин, пероксидаза предотвратяват свръхрастеж на микробни популации.

Слюнката осигурява алкално буфериране, поддържа необходимото за процесите на храносмилане рН и играе важна роля във вкусовите усещания. Подпомага водно-електролитния баланс и участва в рефлексна жажда. В слюнката се откриват няколко протеина с противоболково, хемостазно и заздравяващо действие.

3.2. Състав на слюнката

Слюнката се състои от 98÷99% вода, неорганични йони (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-}), органични вещества – ниско- и високомолекулни (муцини, имуноглобулини, ензими, хормони, антитела, антимикробни съставки и растежни фактори), клетки (епителни клетки, левкоцити, еритроцити), остатъци от храна, микроорганизми и продукти от техния метаболизъм (Nunes et al., 2015).

В слюнката се намират различни протеини като общото им количество е от 50 до 100 пъти по-ниско от това в серума. Днес, със съвременните методи и протеомни изследвания, са открити повече от 2400 различни протеини в слюнката. Голяма част от тях се синтезират от слюнчените жлези или произхождат от екسفелираните епителни клетки и оралната микрофлора. Около 27% от слюнчените протеини произлизат от кръвната плазма и чрез процеси на дифузия, филтрация или активен транспорт преминават в слюнката от гингивалната течност (Miller et al., 2010). Тези, които се синтезират от слюнчените жлези, не са повече от 200÷300 на брой, но относителният им дял представлява около 83% от всички белтъци в слюнката.

Най-важните слюнчени протеини с glandуларен произход са алфа-амилаза, карбоанхидраза, лизозим, хистатини, муцини, богати на пролин протеини (PRPs), статерин и слюнчен-тип (S-тип) цистатини. Едни от тях създават тънък повърхностен защитен слой (статерин, хистатин, PRPs и муцини), а други имат отношение към смазването и образуването на болус и по-лесното преглъщане на храната (статерин и муцин). В оралната течност лизозимът, лактоферинът, пероксидазата, хистатин, амилаза, sIgA имат антимикробно действие с директен цитолитичен ефект и с индиректно действие чрез инхибиране на метаболитни процеси. Повечето от слюнчените протеини изпълняват по няколко функции, проявяват сходни помежду си действия, при което синергично засилват ефекта си (Chiappin et al., 2007).

Тъй като слюнката представлява преситен разтвор на фосфати и калций важна роля играят протеините, които поддържат в равновесие калциевите йони в емайла и пречат на преципитацията им (образуване на зъбен камък). Статерините представляват малки,

богати на тирозин отрицателно заредени фосфопротеини, които в N терминалния си край са свързани с Ca^{++} и имат роля в запазване баланса и минерализацията на зъбите. Два допълнителни фосфосеринови остатъка в молекулата засилват отрицателния им заряд. На богатия на тирозин терминален край на белтъка се дължи ролята му в образуването на тънък защитен повърхностен слой, който задържа бактериите. Богатите на пролин протеини (PRP), подобно на статерина, представляват асиметрични разклонени вериги и имат роля в блокиране на калциево-фосфатното изкрystalизиране и запазване целостта на емайла.

Хистатините са малки пептиди, които се образуват след протеолиза. Носят положителен заряд и са богати на хистидин. Имат антимикробно и противогъбично действие с директно увреждане на клетките. Играят роля на протеазен инхибитор, в поддържането на Ca^{++} баланс и свързват танини. Представляват силен инхибитор на растежа на *Candida albicans*.

Цистатините са цистеинови протеазни инхибитори, присъстващи в различни тъкани и телесни течности. В слюнката те предотвратяват вредната протеолиза на тъканите на устната кухина, като възпрепятстват микробната инфекция. Също така имат ефект върху утаяването на калциев фосфат.

Муцините са интересна група белтъци. Това са гликопротеини, които имат уникални реологични свойства като висока еластичност, адхезивност и ниска разтворимост. Страничните асиметрични вериги на молекулите им създават добри лубрикантни свойства. Муцините са два основни типа (MG1 и MG2) и осигуряват механичната защита на целия храносмилателен тракт, като създават защитно покритие на мукозния епител. Чрез адхезиране на микроби и вируси осигуряват и противомикробно действие. Антимикробният ефект на слюнчената пероксидаза се повишава значително при взаимодействие с муцин. Протеазите на някои паразити и бактерии могат да разграждат муцините и да разтварят слюзта като израз на тяхната патогенност. Такъв механизъм на действие има например и HP (Motamedi et al., 2013).

Албуминът (ALB) е най-голямата фракция от всички плазмени протеини. Слюнченият албумин е резултат от ултрафилтрация на плазмата, извършваща се в клетките на устната кухина (Oppenheim, 1970; Shahbaz et al., 2015), като количество му в слюнката е около 100÷1000 пъти по-ниско от това в серума. Въпреки че се намира в минимални концентрации, заедно с пикочната киселина, той играе важна превантивна роля и подпомага антиоксидантната функция.

Увеличената употреба на медикаменти, които оказват ефект върху слюнката, водят до значителни промени в протеинния ѝ състав и протективните ѝ свойства. Такива са антихистамини, антидепресанти, бета-адренергични агонисти и антагонисти.

В литературата отсъстват данни за корелация между нивата на тотален протеин и албумин в серум и слюнка при хроничните стомашно-чревни заболявания. Липсва информация в каква посока и степен се променят стойностите им с активността на възпалителния процес. Все още не са въведени референтни граници за албумин, а за тоталния протеин отделните автори посочват различни диапазони на референтни граници.

Слюнчените ензими произхождат от секреция в слюнните жлези, от ексфолиирани епителни клетки, от гингивалната течност, от микрофлората и от неутрофилните левкоцити. Основните ензими синтезирани от glandуларните клетки са α -амилаза, лизозим, лингвална липаза.

В края на 19^{-ти} век учените установяват, че слюнката има храносмилателни функции, главно по отношение на приетите с храната въглехидрати и белтъци. Разграждането на въглехидратите в устна кухина се осъществява с помощта на слюнчената алфа-амилаза. Тя е хидролаза, която представлява хелатен металоензим. Специфичната активност на слюнчената амилаза е два пъти по-висока от тази на панкреасната. В серума на здрави хора около 60% от общата активност е за сметка на слюнчената, а 40% – на панкреасната алфа-амилаза. Поради ниското си молекулно тегло тя преминава лесно през бъбречния гломерулен филтър. Паротидните жлези са основните жлези, синтезиращи и секретирани алфа-амилаза (70÷80% от общото количество на ензима в слюнката). Предполага се, че нейният дял от общия саливарен протеин представлява от 40 до 50%. Производството на слюнчената амилаза се инициализира от бета-адренергичен стимул и има рН оптимум на действие около 6.5 ÷ 7.0. Активността на амилазата в слюнката варира в широки граници – между 30 000 и 800 000 U/L, дължащи се на обратна резорбция на вода в набраздения канал и осмотичен транспорт от паротидния канал, и се смята за надежден маркер за серозна клетъчна функция (Almståhl, et al., 2001). Освен дигестивната роля, на слюнчената алфа-амилаза се приписва и антибактериално действие. Счита се, че тя може да модулира адхезията на бактериите към лигавичната повърхност, доказателство за което е нейното наличие и в други лигавични секрети на урогенетален апарат, бронхи и сълзи.

Последни наблюдения показват връзката между секрецията на слюнчената амилаза и физическото, и психическото състояние. Нарастване на ензимната активност се наблюдава в условия психо-емоционален стрес, при тежки физически и спортни упражнения, бягане, колоездене, излагане на студ (Hensten and Jacobsen 2019) и негативни емоции. Много често промените в слюнчената секреция, дължащи се на посочените фактори, а така също на употребата на алкохол, наркотични вещества и кортикостероиди (КС) се придружават от промени в активността на амилазата. (Ravindranath et al., 2014). Намаляване на алфа-амилазата се констатира след облъчване, синдром на Sjogren, отравяния с дигиталис или бета-блокери, а също при анорексия или недостатъчност на аминокиселини.

Наличните в литературата данни за нивата на слюнчената амилаза при пациенти с възпалителни заболявания на ГИТ, както и за вариациите им, според активността на процеса, са все още оскъдни.

Друг храносмилателен ензим, отделян от лингвалните жлези, е липазата. Той е уникален слюнчен ензим с рН на действие 4.5÷5.4. Способен е да хидролизира емулгираните триглицериди от майчиното мляко без участието на жлъчни соли и колипаза. Поради функционалната недостатъчност за секреция на солна киселина в стомаха на новородени, действието на ензима продължава и в стомашната кухина. Понискомаслената храна на новородените, в съчетание с ниската активност на панкреасната липаза и дефицит на жлъчни киселини, налага лингвалната липаза като основен ензим за разграждане на триацилглицеролите, поети с млякото. Ролята на слюнчената липаза намалява значимо в другите възрастови периоди.

Освен храносмилателни, в слюнката се намират и други ензими, с произход от кръвта, гингивалната течност или лизиране на клетъчни елементи и бактерии. Отдавна интерес за стоматологията представляват ензимите на тъканна некроза: Лактат дехидрогеназа (LDH), Аспартат аминотрансфераза (ASAT) и Аланин аминотрансфераза (ALAT), които се асоциират с възпалителни заболявания на пародонта, както и Алкална фосфатаза (ALP) като маркер на костно ремоделиране. Тяхното проследяване може да служи за диагноза и стадиране на заболяването (оценка на тежестта), както и за проследяване ефекта от лечението.

LDH е оксидоредуктаза с коензим никотинамидаденин-динуклеотид (NAD), локализиран в цитоплазмата на почти всяка клетка, като извънклетъчното му присъствие се дължи на клетъчна смърт. Той играе решаваща роля в катаболизма и анаболизма на

въглехидратите. Структурно представлява тетрамер, изграден от два вида субединици – сърдечен тип (H) и мускулен тип (M) и е разпространен в редица тъкани и органи като миокард, скелетни мускули, черен дроб, бъбреци, еритроцити, бял дроб. LDH в цяла слюнка може да произхожда от различни източници, защото тя представлява комбинация на секрети от двете големи и малки слюнчени жлези, течности дифундиращи през устния епител и венците, материал произхождащ от клетъчни и други отпадъци. По тези причини стойностите ѝ в слюнката превишават тези в серума. Счита се, че основният източник на LDH в цяла слюнка не са жлезите, а клетъчните елементи, най-вече сквамозния епител (Lee and Wong, 2009). Доказано е също така, че активността на ензима е добър индикатор и полезен биохимичен маркер за орално здраве и болест. LDH се използва като показател на некроза, особено при наличие на мекотъканни лезии. Освен общата активност на ензима са важни и промените в изоензимния профил. Електрофоретично разделяне на фракциите на LDH в слюнка показва превалирането на LDH-4 и LDH-5 изоензимите (Jafarzadeh et al., 2010). Чрез редица проучвания е установено, *че при пациенти с рак на устната кухина съществува клинична корелация между повишените стойности на общата LDH в серума и изоензимите в слюнката. Тютюнопушенето и употребата на алкохол, които водят до значително повишаване на стойностите на LDH, са два големи рискови фактора за развитие на възпалителни и метапластични образувания на устната кухина и на храносмилателната система.*

Аминотрансферазите ASAT и ALAT участват в обмяната на различни аминокиселини, но като клетъчни ензими служат за оценка на клетъчната увреда. Те са компоненти на слюнката и се откриват в пародонтални тъкани, гингивалния флуид, в емайла на плаката. Интересен е фактът, че при здрави индивиди са измерени по-високи нива на ASAT и ALAT в слюнката, в сравнение с нивата им в серума (Krushna Kishore et al., 2012). Тези два ензима са доказали своята роля в диагностиката на пародонтните заболявания.

Хроничното рецидивиращо възпаление, с което се характеризират заболяванията на стомашно-чревния тракт, е предразполагащ фактор за некротични дегенеративни промени на лигавицата и за канцерогенеза. В литературата има данни за установени повишени стойности на LDH, CRP и СУЕ в кръвта, като неспецифичен отговор на имунологични, инфекциозни и идиопатични възпалителни реакции (Gulhar et al., 2020). LDH се смята за неспецифичен туморен маркер и отразява промените в метаболитните пътища на туморните клетки (Erez et al. 2014) и повишено енергийно потребление

(увеличаване на анаеробната гликолиза) и/или клетъчно разрушаване (Keshet et al., 2009; Wasserman et al., 2010). Сравнително оскъдни са литературните данни относно ензимни активности в слюнка и те са свързани със заболявания, засягащи тъканите в устната кухина. В единични изследвания се проучват промените в ензимните активности в слюнка вследствие на заболявания на ГИТ. Така например Motamedi et al. (2013) показват повишаване на ензимната активност (α-амилаза, LDH и пероксидаза) и понижаване на рН на слюнка при пациенти, страдащи от пептична язва (Motamedi et al., 2013).

Въпреки всичко информацията относно зависимостта на слючените ензими от активността и тежестта на възпалителните гастроинтестинални заболявания, както и тяхната корелация със серумните им нива остава твърде недостатъчна.

3.3. Клетъчен състав на слюнката

Съществува информация, че в 1 ml слюнка се намират 8 милиона човешки и 500 милиона бактериални клетки. Те произхождат от различни източници.

Най-многобройни са епителните клетки – букални и лингвални, които нормално се излющват от лигавичната повърхност при процеса на дъвчене. Епителните клетки, покриващи устната кухина, са бариера срещу механично, химично увреждане и патогенна микробиологична инвазия. Мукозният епител участва в синтеза на секреторната компонента (SC), чиято роля е да стабилизира молекулата на секреторния имуноглобулин А (sIgA). Нормалният лигавичен епител е многослоен, плосък, с висока регенеративна способност. Поради участието си в храносмилателния процес обаче, той остава некератинизиран или частично вроговен на определени места (сложно устроената лигавица на езика с наличните папили) и отделя слуз, за да улесни преминаването на храната. Морфологично сквамозните клетки са с малко ядро и голяма полигонална цитоплазма с множество гранулации и големина $85\div 125\ \mu\text{m}$. Епителните клетки от гингивата и периодонта са по-малки по размери (Okamoto and Watanabe, 2016). По данни на Watanabe броят на епителните клетки в слюнката е около $4 \times 10^5/\text{mL}$.

Левкоцитите (WBC) мигрират в слюнката от гингивалния флуид и тъкани. Дори и при добро здравословно състояние има непрекъснат поток на малки количества течности и левкоцити от венечните капиляри през гингивалния процеп. Този поток се увеличава значително при възпаление. Броят на левкоцитите в норма и патология са обект на редица проучвания. Наблюдават се интраиндивидуални и междуиндивидуални вариации, както и циркаден ритъм в тяхното количество (Streckfus and Bigler, 2002). Съобщава се,

че в 1 милилитър слюнка се намират около $1\div 4 \times 10^5$ клетки (Schiött and Löe, 1970). Левкоцитите са представени предимно от полиморфонуклеари (PMNs) с около 90 % и 10 % мономорфонуклеарни клетки. Мононуклеарните са представени предимно от В лимфоцити (60 %), Т лимфоцити (около 20÷30 %) и макрофаги (приблизително 10 %). Осемдесет процента от PMNs са жизнеспособни и функционални в гингивалния процес. Те са способни да фагоцитират и да убиват микроорганизми, макар че ефективността им е по-слаба в сравнение с кръвните неутрофили. Лизозимът и пероксидазата, които се освобождават от лизозомите на PMNs по време на фагоцитозата, могат също да контролират растежа на микробите в гингивалния процес. Клетките имат способност да действат на малко разстояние от повърхността на гингивата, но и за кратко време (попадайки в слюнката претърпяват бързо литични промени).

При възпалителни заболявания на пародонта в смесена слюнка количеството на неутрофилите се увеличава над 10 пъти. Усилената им миграция се предизвиква от хемотаксични фактори (екзо- и ендотоксини, полизахариди в бактериалната стена, комплементарната система). Активираните неутрофили генерират активни кислородни форми, като по този начин се получава „оксидативен взрив“.

Еритроцитите (RBC) в оралната течност са незначително представени, макар че няма точни литературни данни относно техния брой. Повечето проучвания свързват увеличаването им, както и наличието на кръв в слюнката, с възпалителни периодонтни процеси или раковови заболявания в устната кухина.

Храносмилателните органи са "мирно" населени от огромен брой различни микроорганизми, като голяма част от тях са естествен и здравословен компонент на нашето тяло. Устните микробни общности са едни от най-сложните микробни флори в човешкото тяло, състоящи се повече от 700 различни бактериални видове, а също дрожди (например *Candida*) и протозои (*Entamoeba-gingivalis*) (Jenkinson and Lamont, 2005; Dewhirst et al., 2010). Устната кухина осигурява влажна среда, с относително постоянна температура (от 34 до 36°C) и рН близо до неутралния пункт. Тези условия подпомагат растежа на голямо разнообразие от микроорганизми. Броят им може да достигне до $10^8\div 10^9$ CFU/ml (colony-forming unit), като най-много са бактериите по гърба на езика и небцето. Преобладават предимно Грам-положителни бактерии, като анаеробните са около 10 до 100 пъти повече от аеробните (Marcotte and Lavoie, 1998). Най-разпространеният тип бактерии са *Streptococcus* от групата *viridans* (*mitis*, *sanguis*, *salivarius*). Повечето от тези микроби са безвредни, но при определени условия някои от

тях могат да причинят перорални инфекции, като кариес или пародонтоза (Sakamoto et al., 2005). Всяко нарушение в бариерата на устната лигавица поставя вътрешната среда на тялото в контакт с бактериалната екосистема, което води до проникване на микроорганизми в кръвния поток. Биофилмът на зъбната плака освобождава разнообразни биологично-активни продукти като ендотоксини, цитокини и протеинови токсини от грам-положителни и грам-отрицателни бактерии, колонизиращи повърхността на зъба около гингивалния край и междупроксималните области.

Микроорганизмите се възползват от щедрото „хранене“, което получават от редовния приток на храна. Слюнката благоприятства развитието на т. нар. денитрифициращи микроорганизми, които не образуват киселини и убиват патогенни микроорганизми с използването на нитрат (NO_3^-) вместо кислород, превръщайки го в нитрит (NO_2^-) (Petersson et al., 2007). Влизайки в контакт с киселина, нитритът се превръща в силен цитотоксичен агент, въздействащ на бактериите в непосредствена близост. Слюнчените жлези активно натрупват нитрати от кръвта и ги отделят в слюнката, където те изпълняват няколко функции. Нитратът от слюнката реагира със стомашната киселина и може да „убие“ потенциални патогени в стомаха, попаднали от устата. Чрез ентеро-саливарната циркулация на приетите с храната нитрати, която е важна част от екзогенния път за синтез на азотен оксид в организма, се потенцира мукозната лигавица с усилване на кръвотока, слюзната секреция и бикарбонатна (HCO_3^-) продукция в ГИТ (Petersson et al., 2007). Конкуrentните отношения (синергични или антагонистични) на микроорганизмите имат регулиращ ефект при поддържането на оралната хомеостаза и предотвратяват свръхрастеж, както на комесалната, така и на патогенната микрофлора. Над 90% от експозицията на човешкото тяло с микроорганизми е чрез мукозната повърхност на храносмилателния тракт. Микробиалната екосистема съществува съвместно с клетките на имунната система и е важен фактор за правилното развитие на мукозния имунитет. Симбиотичните взаимодействия макро-микроорганизъм подпомагат защитата срещу колонизация с патогенни микроорганизми и секреция на антимикробни пептиди, участващи в регулаторни и ефекторни отговори на придобития имунитет. Много от бактериите в устата отделят ензими, които участват в разграждането на хранителните остатъци, останали в нея (Marcotte and Lavoie, 1998).

Видът и качеството на бактериалната микрофлора в устната кухина оказват голямо влияние върху лигавичната бариера и локалната имунна защита по протежение на целия

гастро-интестинален тракт. Нарушеният баланс (дисбиоза) се асоциира с редица заболявания на храносмилателната система. Приема се, че най-честите причини за нарушена хомеостаза гостоприемник/микроорганизъм са намалена имунна защита, хранителен дефицит, намален слюнчен поток, употреба на лекарства, липса на съзъбие или наличие на протези (Marcotte and Lavoie, 1998).

Повишаване на клетъчни елементи в оралната течност се наблюдава често при различни стоматологични заболявания. Повечето данни в литературата са свързани с броенето и диференцирането на клетъчните елементи при заболявания на пародонта, левкоплакия и като скрининг за рак на устната кухина. Трябва да се има предвид, че с напредване на възрастта се променя стоматологичния статус (пародонтоза, кариеси, протези или мостове), което може да създаде проблеми в интерпретация на резултатите.

Не са открити проучвания, предоставящи информация за заболявания на ГИТ, които могат да се отразят, респективно да променят клетъчния състав на слюнката, особено при хронични възпалителни заболявания на червата или стомаха. Липсва отговор на въпроса възможна ли е корелация между промяната в клетъчния състав и активността на възпалителният процес при гастроентерологични (ГЕ) заболявания.

При ХВЧЗ често се наблюдават и екстраинтестинални прояви и симптоми с честота на разпространение варираща от 6 до 47 %. Една от най-честите прояви са тези, засягащи устната кухина. Специфичните орални изяви (грануломатозни промени, идентични с тези от ГИТ) могат да спомогнат ранното диагностициране и мониторирането на активността на ХВЧЗ-заболяванията и не трябва да се игнорират (Lankarani et al., 2013). При ХВЧЗ е възможно да възникне и неспецифично засягане на жлезистата и лигавична тъкан в устната кухина, причинено от лекарствени средства, инфекции и разнообразие от недостатъчности на витамини и микроелементи. Редица проучвания показват, че около 60% от пациентите с болест на Крон имат орални прояви, включително хейлит, язви, фисури и глосит. В 5 до 10% от случаите това може да е първият признак на заболяването и да предхожда с години появата на чревно заболяване (William et al., 2013).

В литературата съществуват редица данни за свързаността на пероралното здраве с вариации в оралния микробиом (Han and Wang, 2013), а също и със заболявания, като ХВЧЗ, колит (Rautava et al., 2014), цъолиакия (Francavilla et al., 2014), затлъстяване (Goodson et al., 2009), артрит (Wolff et al., 2014), атеросклероза и други.

3.4. Защитна роля на слюнка

Древните хора са познавали антимикробните свойства на външните телесни течности (слюнка, коластра, урина), поради което са ги прилагали локално както за профилактика, така и като лечебно средство. Защитните свойства на слюнката се обуславят от специфични и неспецифични фактори.

Специфичните имунни фактори на защита са проява на мукозната имунна система, като секреторният IgA (sIgA) е неин основен представител. sIgA се различава структурно от серумния IgA – съществува като полимерна молекула, съставена от два (или повече) IgA мономера (300 kDa), свързани помежду си посредством J (свързваща) верига (15.6 kDa) и SC-компонент (70 kDa) (Mantis and Forbes, 2010). Веригата J е полипептид, който се синтезира в плазматичните клетки и участва в иницирането на полимеризацията на IgA. SC-компонентът, произведен от мукозни епителни клетки, стабилизира структурата на полимерния IgA и предпазва молекулата от протеолитична атака в секретите. Всеки мономер IgA е оформен от четири полипептида, две α -тежки вериги и две леки вериги (капа или ламбда), свързани ковалентно чрез дисулфидни връзки. Структурната организация на sIgA е демонстрирана на фигура 3 (Bonner et al., 2009).



Фиг. 3. Молекулен строеж на sIgA (Miligam 2013)

sIgA, основното антитяло, произведено от В-лимфоцитите, разположени в мукозно-асоциираната лимфоидна тъкан (MALT). Представител е на функциониращата мукозната имунна система и е най-изобилният имуноглобулин, намерен в слюнка и в чревни секрети. Представлява 10% от общото количество IgA в организма, като често се обозначава и като IgA2. Останалите 90% са за сметка на серумната фракция (IgA1), която е продукт на синтез на В-клетки в костния мозък и представлява основно монмерна форма. Инхибирането на бактериалната адхезия е един от най-

важните механизми на sIgA за защита срещу мукозна бактериална инвазия, ограничава свързването на бактериите с епителни клетки и проникването на антигени от външната среда през лумена на червата към вътрешната среда. sIgA неутрализира бактериални ензими и токсини, може да действа синергично с вродени имунни фактори, присъстващи в секретите, като лактоферин, пероксидаза и муцини. Като се има предвид ролята на IgA в модулиране на стомашно-чревния имунитет, измерването на sIgA се явява препоръчителен тест при пациенти с цъолиакия, БК и УК. При много хора с ниски нива на sIgA дълго време е търсена причината, свързана с редица имунологични проблеми, като алергии, автоимунни, хронични кожни заболявания и инфекции. Установено е, че индивиди, страдащи често от кандидоза имат по-ниски нива на sIgA. Подобна е находката при пушачи, при БК и УК (Serutti et al., 2011). Специфично и уникално свойство на стомашно-чревния тракт е, че въпреки наличието на sIgA и други имуноглобулини, сапрофитната флора не се унищожавя. Гостоприемникът може да направи разлика между симбиотичните и безвредните бактерии и периодично нахлуващите патогенни микроорганизми. Толерантността към сапрофитната микрофлора и естествените хранителни антигени, както и активната имунна реакция към патогените осигурява хомеостазата на ГИТ, поддържана от многобройни фактори.

Имуноглобулин G (IgG) и Имуноглобулин M (IgM) се откриват в по-малка концентрация в слюнката и имат значително по-скромна роля в имунната защита на мукозата.

В неспецифичната имунна защита са включени епителната бариера, приютила комесалната микробна флора, антимикробни пептиди, патоген-разпознаващи рецептори, компоненти от системата на комплемента, С-реактивния протеин (CRP), клетките на вродения имунитет (дендритни, моноцитно-макрофагеални клетки, неутрофили, мастоцити), локално отделени цитокини и хемокини.

Лизозимът е основният ензим на неспецифичната слюнчена имунна защита (Meuer and Zechel, 2001). Секретира се основно от подчелюстните и сублингвалните жлези (Noble, 2000; Fábíán et al., 2012). Хидролизира 1-4 бета-гликозидната връзка на пептидогликана от бактериалната клетъчна стена, което води до клетъчно разграждане и смърт. Лизозимът имитира до голяма степен системата на комплемента в серума, тъй като проявява по-силно литично действие спрямо бактерии, свързани с имуноглобулини. Грам отрицателните бактерии като цяло са по-устойчиви от Грам-позитивни поради външния липополизахариден слой.

Друг важен фактор на неспецифичната защита е лактоферин – белтък от семейството на трансферините. Намира се във вторичните гранули на неутрофилите и в почти всички секрети – слъзи, носен секрет, интестинален мукус и генитални секрети. Той отразява активността на неутрофилите и е маркер за възпаление. Слюнченият лактоферин има антибактериално и противопаразитно действие – свързвайки свободното желязо, го прави недостъпно за микробна употреба и така възпрепятства растежа и развитието на множество бактериални видове. Чрез механизмите на протеолиза или възпиране навлизането на бактерии и вируси в клетките лактоферинът упражнява бактерицидно и противовирусно действие.

Миелопероксидазата е друг ензим, представител на неспецифичната имунна защита. Отделя се от левкоцитите, влизащи през гингивалната цепнатина. На нея се дължат 15÷20% от общата пероксидазна активност в цялата слюнка.

В литературата няма достатъчно данни за нивата на саливарния sIgA при хронични възпалителни състояния на стомашно-чревния тракт (болестта на Крон, улцерозен колит, гастрити). Не са добре изяснени промените в стойностите на sIgA според активността на процеса, както и корелационните отношения между серумните нива на IgA и слюнчените нива на sIgA.

3.5. Оксидативен стрес и антиоксидантна защита на слюнката

Нитратите присъстват в околната среда и често в храната ни. Те са част от азотния цикъл в организма и важен източник за ендегенен синтез на азотен оксид (NO). NO е липофилна газообразна молекула, който се явява мощен възпалителен медиатор, поради силната си реактивоспособност спрямо кислород, супероксидни радикали и желязо-съдържащи съединения. Има кратък полуживот – от 1 до 10 секунди, което създава технически трудности за количественото му определяне. Вместо директно измерване на NO, за оценка неговата продукция се определят нивата на неговите стабилни аниони нитрати (NO₃⁻) и нитрити (NO₂⁻), получени от реакцията на NO със супероксидни радикали (Möller et al., 2019). В условията на ниско поглъщане на екзогенни нитрати, нормална функция и уринна екскреция, тези нива отразяват общата продукция на NO от организма.

NO е жизненоважна биомолекула, чието физиологично действие включва невротрансмисия, имуномодулация, регулиране на кръвното налягане, повлияване на

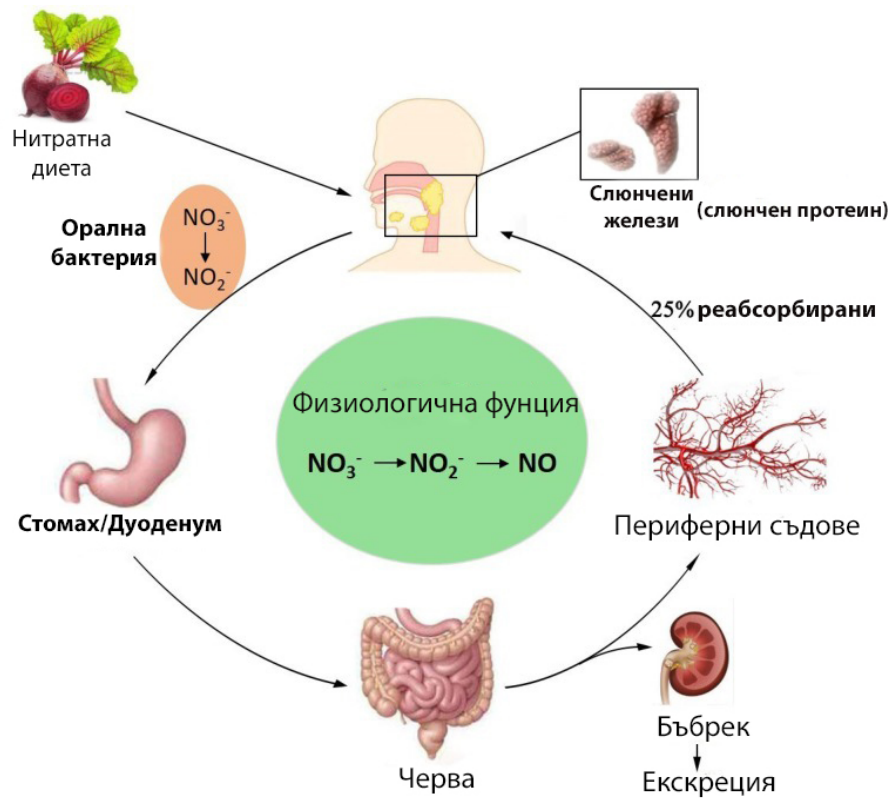
ендотелната и тромбоцитна функция и упражнява защитна роля на гастроинтестиналната мукоза (Jin and Loscalzo, 2010).

Съществуват два пътя за синтез на азотния оксид (NO). В класическия (ендогенен) път той се продуцира от L-аргинин и молекулен кислород с помощта на три изоформи на NADPH-зависими ензими, азотен оксид синтаза (NOS) (Knowles et al., 1994; Förstermann and Sessa, 2012). Две изоформи на NOS са конститутивно експресирани в неврони и ендотелни клетки и се обозначават като nNOS и eNOS. Това са Ca^{2+} зависими ензими и произвеждат NO в отговор на физиологични стимули. Ендотелната изоформа на NOS е локализирана към микроваскуларната мрежа на субмукозно-лигавичния слой и произвежда NO с пулсова секреция за кратък период от време (секунди, минути). Катализираната от нея продукция на NO действа вазодилативно, подобрява трофиката на лигавицата, защитава епителните клетки срещу индуцирана от H_2O_2 токсичност и намалява левкоцитната адхезия към ендотелните клетки (Kim and Kim, 1998; Vinion et al., 2000). Невроналната NOS медира синаптичното предаване на сигнали и модулирането на някои физиологични функции като учене, памет и неврогенеза (Förstermann and Sessa 2012).

В условията на хронично възпаление, провъзпалителни цитокини активират синтеза на NO чрез третата изоформа на NOS, наречена индуцируема (iNOS). Тя е Ca^{2+} независима и е представена в разнообразие от клетки – макрофаги, дендритни клетки, неутрофили, епителни клетки в ГИТ и белодробна мукоза, гладко-мускулни клетки, стромални клетки от вторичните лимфоидни органи, микроглия, астроцити, неврони от ЦНС, клетки на кръвно-мозъчната бариера (Ehab et al., 2012; Sonar and Lal 2019). iNOS е отговорна за прекомерното генериране на RNS в условие на възпаление като при това защитната им функция преминава в цитотоксична. Индуцируемата NOS обикновено синтезира 100-1000 пъти повече NO от конститутивната синтаза. Това е важен адаптивен механизъм на неспецифичната имунната защита на гостоприемника, който допринася за клетъчно медираната цитотоксичност срещу бактерии, вируси и туморни клетки (Tuteja et al., 2004). Прекомерната продукция на реактивни азотни видове се нарича нитрозативен стрес (Klatt and Lamas, 2000; Son, 2012). Повишени нива на нитрат/нитрит са открити при много заболявания като сепсис, улцерозен колит, ревматоиден артрит, диабет тип I и други. Проведени са интересни проучвания с ХВЧЗ-пациенти, при които се установява позитивна корелационна връзка между повишената концентрация на азотния оксид в серум и активността и давността на хроничния възпалителен процес

(Avdagić et al. 2013). Доказана е и взаимовръзка между локалната продукция на тази важна молекула за поддържане на хроничното възпаление и ендоскопската находка при активност на процеса (Biasi et al. 2013)

Вторият път е екзогенен и неензимен. Приетите с храната нитрати, след абсорбция в горния стомашно-чревен тракт, чрез кръвта достигат слюнчените жлези, където се секретират и частично се редуцират до нитрити от оралната микрофлора. В условията на киселата среда и редуциращи вещества в стомаха неорганичните нитрити неензимно се превръщат в NO и други азотни оксиди (фигура 3). Около 25% от пероралното натоваарване с нитрати се отделя от слюнчените жлези, а слюнчената им концентрация е около десет пъти по-висока от тази в плазмата (Sundar et al., 2013; Ma et al., 2018). Съотношението нитрат към образувания от бактериалната редуктаза нитрит е приблизително 6:1. Нивата на плазмения нитрит на гладно обикновено са в диапазона 50–100 nmol, докато в слюнката те са от 100 до 1000 пъти по-високи и тази разлика се увеличава значително след прием на нитрати (Hezel and Weitzberg, 2015). Около 60% от погълнатия нитрат се екскретира в урината в рамките на 48 часа. Няколко *in vitro* проучвания показват, че вторичният път на образуване на NO и сродни съединения, играе важна роля за стомашната защита на гостоприемника чрез повишаване на киселино-зависимото убиване на погълнатите патогени (Björne, 2004). Група учени доказват, че кръвоснабдяването и дебелината на слузния слой в стомашната лигавица се увеличава в отговор на богатата на нитрити слюнка (Petersson, 2008). Стомашната лигавица е подложена на действието на ендогенни вещества (солна киселина, пепсин и др.) и на екзогенни вещества – хранителни и токсични (етанол, лекарства, бактерии). Мукозата предоставя физическата защита срещу бактерии и химическата – срещу солната киселина. Простагландините и NO играят централна роля в защитните механизми чрез усилване на кръвотока в стомаха, стимулиране на слузната секреция, инхибиране на привличането и активирането на неутрофилните клетки. На ниво дуоденум NO стимулира както слузната секреция, така и бикарбонатната (HCO_3^-) продукция, посредством което се осигурява защита на чревната лигавица от киселото стомашно съдържимо.



Фигура 3. Энтеро – саливарен метаболизъм на нитратите (Ma et al., 2018)

Хроничното възпаление поддържа продукцията на високи нива на NO чрез iNOS, като това се свързва и с индуциране на неопластична трансформация – често усложнение в хроничния ход на възпалителните заболявания. В устната кухина нитритите вторично могат да взаимодействат с аминокиселини, лекарства и др., при което се образуват канцерогенни нитросъединения (d'Ischia et al., 2011). Тези реакции протичат с по-голяма скорост в кисела среда и се ускоряват в присъствие на тиоцианати. Нитрозамините са токсични и се считат за канцерогенен фактор, засягащ стомашната лигавица. NO и други RNS, като пероксинитрит, получен при взаимодействието между $\text{NO}\bullet$ и $\text{O}_2\bullet$, реагират с тирозин, водещ до производство на нитротирозин. Тези агенти със силен оксидативен потенциал могат да предизвикат увреждане и фрагментация на ДНК чрез инхибиране на репарацията или чрез модификация на структурата ѝ като нитрозативно дезаминиране, образуване на нитрозамин, ДНК алкилиране и др. (de Oliveira et al., 2017).

В литературата са натрупани данни за ролята на NO и RNS в патогенезата на редица невро-дегенеративни заболявания (напр. болест на Алцхаймер или болест на Паркинсон (Picón-Pagès et al., 2019), на хроничната сърдечна недостатъчност, диабет, миокарден инфаркт и др. (Pacher et al., 2007). Проучванията относно нивата на

нитрат/нитрит в слюнка и тяхната взаимовръзка с основни характеристики на ХВЧЗ все още са твърде оскъдни.

Всички процеси на храносмилане, сложните взаимоотношения макро/микро-организъм, както и тези между самите бактериални видове, водят до генериране на различни RONS. Кислородът е жизнено необходим за аеробните организми, но при усвояването му неизбежно се образуват и кратко живеещите ($t_{1/2}=10^{-9}$ sec) ROS и RNS. Наличието на несдвоен електрон в ROS ги прави силно нестабилни и реактивоспособни молекули, които инициират серия от верижни реакции, водещи до значително увреждане на тъканите. Към ROS спадат супероксидният анион ($\bullet\text{O}_2^-$), хидроксилният анион ($\bullet\text{OH}$), водородният пероксид (H_2O_2), хипохлористата киселина (HClO) и синглетният кислород ($^1\text{O}_2$). Оксидативният стрес се определя като резултат от дисбаланса между генерирането на реактивни кислородни видове и антиоксидантните защитни системи. Той може да се дължи на повишено образуване на свободни радикали и/или на намалена антиоксидантна защита. Както ROS, така и RNS при ниски и умерено завишени концентрации са сигнализиращи молекули, участващи в митогенния отговор или в защита срещу инфекциозни агенти. Физиологично, полиморфонуклеарните неутрофили (PMN) са основен генератор на свободни радикали. Оксидативният взрив е абсолютно необходим за стартиране на имунологичните реакции, активиране на неутрофилните клетки и фагоцитозата и е пример за първичната имунна реакция на организма срещу чуждородовите антигени. Загубата на равновесие между ROS/RNS и антиоксидантите лежи в основата на множество локални и системни заболявания. Оралният оксидативен стрес и механизмите на възникване, могат да обяснят връзката между периодонтното състояние и сърдечно-съдовите заболявания, метаболитния синдром или диабета (Liguori et al., 2018).

Освен другите си протективни свойства, слюнката представлява и първа линия на защита срещу медирания от свободните радикали оксидативен стрес. Поради наличие в човешката слюнка на редица антиоксидантни вещества, тя действа като антиоксидантна система. Антиоксидантите могат да бъдат ензимни (супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза, (GSPx) и неензимни (витамины E, C, A, пикочна киселина, флавоноиди, тиоли). Стимулираната слюнка съдържа по-ниска концентрация на антиоксиданти, но когато се вземе предвид дебита, антиоксидантният капацитет се явява по-висок от този в нестимулирана слюнка (Dodwad et al., 2011). Секретът от паротидните жлези е основният източник на антиоксидантни

съединения в слюнката. Пикочната киселина е краен продукт на катаболизма на пуриновите нуклеотиди. Явява се основен ендегенен антиоксидант в слюнката, който покрива около 85% от антиоксидантния капацитет, като концентрацията ѝ корелира добре със серумните нива. Друг важен антиоксидант в слюнката е албуминът. Макар и в количество от 100 до 1000 пъти по-ниско от това в серума, той играе важна превантивна роля, допълваща антиоксидантната функция на пикочната киселина. Много други молекули проявяват антиоксидантно действие такива като, глутатион редуктаза, лизозим, лактоферин или CAT, SOD, глутатион и слюнчена пероксидаза (Maciejczyk et al., 2019). Слюнчената пероксидаза се секретира от слюнчените жлези, а миелопероксидазата от полиморфонуклеарни неутрофили. SOD е ключов антиоксидантен ензим, който катализира дисмутацията на два супероксидни радикала до O_2 и H_2O_2 . Саливарната антиоксидантна система е важна за хомеостазата в устната кухина, но има и решаваща роля в киселата среда на стомаха, където оксидативният и нитрозитивният стрес са значителни.

Окислителният стрес може да бъде основен фактор за увреждането на тъканите и фиброзата, които характеризират болестта на Крон (Alzoughaibi, 2013). При тези пациенти се наблюдава дисбаланс между повишените нива на реактивни кислородни видове и намалените антиоксидантни защити. Съобщава се за понижени нива на витамини С и Е в кръвта и понижени нива в чревната лигавица на Cu, Zn, супероксиддисмутаза, глутатион, витамин А, С, Е и β -каротин (Alzoughaibi, 2013).

В литературата се съобщава за връзка между саливарния антиоксидантен статус и оралната хигиена с пародонтния статус. Засега липсват систематични изследвания, свързани с оксидативния стрес и антиоксидантната защита в слюнката, при индивиди със системни заболявания, включително и при такива със заболявания на ГИТ.

3.6. Фактори, променящи състава и защитната способност на слюнката

Слюнката е първият биофлуид, с който влизат в контакт редица токсични вещества – цигарен дим и катрани, алкохол, лекарствени вещества и други. Те се явяват рискови фактори, водещи до значителни количествени и качествени промени в състава на слюнката. Цигареният дим съдържа над 4000 различни химични съединения, от които 400 са доказани канцерогени. Сред най-токсичните съединения са някои полициклични ароматни въглеводороди и N-нитрозамини. В допълнение, цигареният дим има високи нива на реактивни кислородни видове, пероксинитрит, пероксинитрат, свободни радикали и реактивни органични съединения, които инициират оксидативен стрес и

модулират ендотелната функция, зависима от азотния оксид (Berkowitz et al., 2018). Тютюнопушенето, действайки механично и химично върху мукозата, води до промяна в йонния, протеиновия състав, буферния капацитет и рН на слюнката. Така се променя балансът между популациите на комесалните микроорганизми и настъпва дисбактериоза. Намалявайки защитните свойства на слюнката, лигавицата в устна кухина, ГИТ и дихателна система става податлива както на възпалителни, така също и на дегенеративни промени (Söder et al., 2002). Цигареният дим потиска неспецифичните защитни функции на слюнката чрез значително понижаване нивата на слюнчените ензими и буферния ѝ капацитет, но и до потискане на специфичната имунна защита чрез понижаване нивата на IgA, IgG, и IgM (Shilpashree and Shriprasad, 2012). Проучванията доказват, че антиоксидантната функция на слюнката при пушачи намалява с повече от 1/3 от нормалните нива (Pullishery et al., 2015). Стомашно-чревният тракт също не е пощаден от ефекта на канцерогените, съдържащи се в цигарения дим. Те променят производството на слюз в стомашната и чревната лигавица, а така също възпрепятстват възстановителните процеси в нея. Освен това вазоконстрикцията и прокоагулантното действие на цигарения дим упражняват различни ефекти на стомашно-чревно ниво. Съществуват доказателства, че тютюнопушенето увеличават рецидивите на язвена болест и се свързва с ХВЧЗ, развитието на рак на хранопровода, стомаха, и дебелото черво (Li et al., 2014).

Алкохолът и неговите метаболити чрез директен контакт с лигавицата на ГИТ, може да предизвикат множество метаболитни и функционални промени, потенциращи възпалителните процеси. В стомаха алкохолът намалява отделянето на стомашна киселина, а засягайки гладката мускулатура на тънки и дебели черва, променя перисталтиката им. Освен това той инхибира абсорбцията на хранителни вещества, повлиява чревната микробиота, засяга лигавичния имунитет и бариерната цялост на мукозата, като я превръща във входна врата за различни патогени (Bishehsari et al., 2017).

4. Приложение на слюнката в съвременния диагностичен процес

Изследването на слюнка датира от дълбока древност. В Китай по консистенцията, цвета и мирисата на слюнката са правили заключение за здравословното състояние на пациентите. Древните лекари на традиционна китайска медицина са смятали, че кръвта и слюнката са „братя“, понеже имат еднакъв произход в организма (Hu 2007; Tiwari, 2011). Според китайската медицина слюнката се състои от две основни части. Една част е „по-чиста и по-рафинирана“, свързана е с бъбреците, като основната ѝ функция е да

овлажнява, подхранва и почиства зъбите. Другата част е „по-мътна и по-малко рафинирана“, свързана е с органите на храносмилането (най-вече стомаха) и участва основно в процесите на разграждане на поетите с храната вещества (Mind-Body Medicine, 2009; Streckfus and Kulasinghe, 2015).

В древността са мислили, че слюнката притежава изключителна мощ. Използвана е от магове и жреци, за да им осигури господство и надмощие при проклетия и магии. И до днес в много култури майки и баби използват слюнката си да почистят лицето на детето, позовавайки се на „вълшебните“ ѝ свойства. Церемониално заплюване се практикува в Китай, Арабия, Гърция, Абисиния и други. За тези народи слюнката притежава творчески и лечебни качества, носи добър късмет и е полезна за изгонването на демоните (Nguyen and Wong 2007).

Влиянието на психо-емоционалния стрес върху слюноотделянето се е използвал като своеобразен детектор на лъжата в древен Китай. На лице, обвинено в някакво престъпление, са давали хапки сух ориз. При виновните и тревожните индивиди се е наблюдавало затруднено дъвкане и трудно преглъщане, поради блокиране на слюнчената секреция (Streckfus and Kulasinghe, 2015).

Съвременният анализ на слюнка, датиращ още от края на 19^{-ти} век, се базира на методи, разработени и използвани от модерните за този период биохимия и физиология. През 1898 г. Chittenden и Mendel измерват общите органични съставки, соли и хлоридив слюнката (Tiwari, 2011). По това време изследователите вече знаят, че слюнката има значение за храносмилането, главно поради съдържащата се в нея амилаза. В изследванията от началото на 20^{-ти} век се откриват и доказателства за влиянието на диетата (вида на храната) върху състава на секретиранията слюнка.

4.1. Диагноза и оценка на риска при заболявания на устната кухина в стоматологията

Анализите на слюнка се използват в стоматологията за проучвания при заболявания на устната кухина и за оценка на риска от кариес, чрез измерването на буферния капацитет на слюнката, бактериалното съдържание и баланса на йонния ѝ състав (Lima et al., 2010). Промените в компонентите на оралната течност може да бъдат полезни за диагноза на хронични възпалителни заболявания (пародонтит) и рак на устната кухина. Изследвани са различни слюнчени биомаркери за диагностика и прогноза на пародонталните заболявания. Те включват възпалителни медиатори, ензими, епителни кератини, имуноглобулини, слюнчени йони и хормони. Измерването на NO и

неговите крайни метаболити, CRP, пикочна киселина, ASAT и прокалцитонин в слюнката са също ценни за диагнозата на пародонтните заболявания. През последните години със въвеждането на имунохроматографски тест (РОСТ) за матрична металопротеиназа-8 в слюнка (ММР-8, ензим, отговорен за разрушаването на тъканите) се спомага ранната им диагноза, както и мониторирането на прогресията им. Наскоро беше съобщено, че разтворим в слюнката Toll-Like Receptor 2, IL-4 и IL-18 също корелират положително с процеса на пародонтоза. Доказано е, че локалните хронични орални възпалителни процеси могат да повлияят различни системни заболявания като гастрит, колит, атеросклероза, ревматоиден артрит и съдови заболявания (Babu and Gomes, 2011).

В края на 20^{-ти} век и началото на 21^{-ви} век навлизането на нови високочувствителни технологии и методи като масспектрометрия, полимеразна верижна реакция, микрочипове и наносензори допринасят за идентифицирането и характеризирането на слюнчени компоненти, включително ДНК, РНК, протеини, метаболити и микроорганизми с важно диагностично значение и приложение. От 2008 година се въвежда понятието „саливомика“, което отразява знанията за различните комплексни и динамични съставки в слюнката. Саливомиката включва геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и микробиомика. През последните едно-две десетилетия увеличеният брой на идентифицираните и охарактеризирани слюнчени компоненти разширява диапазона на приложение на слюнката за диагностичния процес на различни заболявания (Chiappin et al., 2007; Martí-Álamo et al., 2012).

4.2. Инфекциозни заболявания

Счита се, че слюнката е полезен алтернативен диагностичен инструмент за много широко разпространени и социално-значими инфекциозни заболявания като вирусен хепатит, туберкулоза и НР-инфекция. В хода на хепатит вирусна инфекция IgM, IgG и IgA антитела се откриват не само в серума, но и в слюнка, като редица изследователи сочат, че нивата им добре корелират помежду си (Hettegger et al., 2019). На протеомно ниво има разработени Point-of-care тестове (РОСТ) за антитела в слюнка, за откриване на вирусите на хепатит А, хепатит В, хепатит С, ХИВ-1, вирус на морбили, рубеола, паротит и вируса на везикуларен стоматит. Тези тестове могат да се използват в спешните отделения, в медицинските и стоматологичните клиники и не на последно място в домашни условия. През 2012 г. американската FDA е одобрила OraQuick® In-Home HIV тест за откриване на вируси на HIV-1 и HIV-2 с орален тампон. Така

скринингът става лесен и достъпен и от сферата на лабораторията преминава в активен самоконтрол в домашни условия (Yoshizawa et al., 2013). При заразени лица в оралната течност също може да се откриват бактериални ДНК или вирусни антигени (например антигените на HBV и HCV) (Chen et al., 2009). Слюнката се явява неивазивен материал за намиране на антигени на *Mycobacterium tuberculosis* и много вируси, включително вируса на Ебола, HSV, EBV чрез съвременната техника, използваща полимеразно-верижна реакция (PCR). С тази методология може да се установи НР-антиген в слюнка или зъбна плака, понеже устната кухина е чест източник на инфекция и реинфекция в етиологията на хроничните гастрити. (Martí-Álamo et al., 2012). РОСТ с биологичен материал слюнка позволяват да се правят скринингови прегледи и оценка на големи популации, като протиепидемична стратегия и управление на социално значими инфекциозни заболявания.

Вирусът *nCoV-2019* може да се разпространява чрез капчици аерозолна слюнка. Освен белите дробове, епителните клетки на езика и слюнчените жлези, Т и В клетки на устната лигавица експресират ACE2 рецептори и могат да бъдат инокулирани от вируса. При Coronavirus disease (COVID-19) често има субективни данни, свързани с устната кухина (сухота, нарушен вкус). Основното диагностично средство към момента е количествено определяне чрез PCR-техника на вирусна RNA в назофарингеален секрет, взет при дълбоко гърлено обтриване с тампон. Вирусна RNA се открива и в слюнка, като при едни от най-последните проучвания се доказва, че това може да се случи на много ранен етап от заразяването. Поради лесната и нетравмираща процедура на получаване, твърде вероятно е слюнката да се окаже предпочитаният материал за диагностиката на това пандемично заболяване в близко бъдеще (Xu et al., 2020; Shamsoddin, 2020).

4.3. Автоимунни заболявания

Синдромът на Sjögren (SS), засягащ предимно жените в около 90%, е третото най-често срещано автоимунно заболяване с честота между 0,05 и 4,8% (Pillemer et al., 2001). То се характеризира с хронично възпаление и унищожение на екзокринните жлези, главно слюнчени и слъзни. Ксеростомията, вследствие на понижената слюнчена секреция, води до разнообразие от симптоми и усложнения, засягащи устната кухина, като прогресиращ зъбен кариес, гъбични инфекции, орална болка и дисфагия. Стоматолозите са първите, които се сблъскват с тези пациенти. Слюнката се явява подходящ биофлуид за ранна диагностика, мониторинг и прогресия на заболяването. Установено е, че съществуват значителни промени в протеома и транскриптома при

пациенти със SS, като специфичният профил на тези слюнчени маркери отразяват увреждането на жлезисти клетки, активиран антивирусен имунен отговор или програмирана клетъчна смърт, за които се знае, че участват в патогенезата на заболяването. Валидиран е панел от три транскриптомни и три протеомни биомаркери в слюнка, с който може да се осигури удобно и надеждно средство за ранна диагноза (Zhang Y et al., 2016). Освен при SS, при което има типично засягане на тъкани и органи в устната кухина, слюнката може да бъде информативен източник и за други системни аутоимунни заболявания, такива като системен лупус еримадодес, пемфигус вулгарис и болест на Бехчет (Saccucci et al., 2018).

4.4. Злокачествени заболявания

Напълно естествено е, слюнката да се явява подходящ биологичен материал за изследване на различни биомаркери при орален плоскоклетъчен карцином (OSCC) – най-честото злокачествено заболяване на устната кухина. Такива са онкогените C-мус, c-Fos, C-Jun, тумор-супресорните гени p53, p16 и др. (Huang et al., 2014). В скорошно проучване се установява значително увеличение на три туморни маркера в слюнка при пациенти с OSCC – Cyfra 21-1, TPA (тъканен полипептиден антиген) и CA-125 (Sri Santosh, 2020).

Биомаркери за туморни процеси, развиващи се в разнообразие от тъкани, могат да бъдат и т.нар. циркулиращи извънклетъчни DNA, mRNA, microRNA и екзосоми, които се откриват в различни биологични течности, включително и слюнка. Изследвания от последните години доказват наличие на повече от 3000 вида mRNA и над 300 вида microRNA в слюнка на здрави и болни лица, което поставя началото за използване на транскриптомния анализ за диагностика и мониториране на различни неопластични заболявания (Zhang et al., 2016). MicroRNA са група малки некодиращи РНК, съставени от 20-24 нуклеотида, които участват в регулацията на генната експресия (Peng and Croce 2016) и имат отношение към редица биологични процеси като клетъчна диференциация, пролиферация и апоптоза (Lampignano et al., 2020). Много от изследванията констатират, че дисрегулацията на microRNA играе решаваща роля в туморните тъкани, действайки като туморни супресори или онкогени (Kiss et al., 2013; Aksenenko et al., 2019). Профилиране на характеристични тъканни microRNA, позволява прилагането им в диагностичния процес като „течна биопсия“ за откриване на неоплазии дори в отдалечени места, например рак на гърдата, панкреас и бял дроб (Wang et al., 2017). Епигенетично абераантно метилиране и соматични мутации на тумор-специфични DNA са доказани при повече от 50% от пациентите с неопластични заболявания. Тези туморни

биомаркери могат да бъдат установени и в екфолирани орални мукозни клетки, в слюнката или други телесни течности (Zhang et al., 2016).

Освен транскриптомния анализ и протеомният анализ на слюнка може да бъде използван за ранно откриване и мониториране на някои злокачествени тумори. Така например при жени с диагноза рак на гърдата се откриват повишени нива на CA15-3 и erbB-2 (epidermal growth factor receptor) в слюнката. Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) е одобрила слюнчени тестове за ранно откриване появата на метастази при рак на гърдата (Streckfus and Kulasinghe, 2015).

4.5. Сърдечно-съдови заболявания

Екипът на Miller et al., (2010) докладва, че различни аналити, свързани с исхемичната каскада при остър коронарен синдром, могат да бъдат открити и в слюнката. Установено е, че саливарни мултиплексни тестове за откриване на остър миокарден инфаркт (ОМИ) и комбинирането им с ЕКГ увеличават диагностичната чувствителност до 90÷100%. Разработената нанобиочипова РОСТ система CARDIUS за скрининг на остър миокарден инфаркт използва високоспецифични антитела срещу миоглобин, hsCRP, миелопероксидаза и IL-1 β и дава възможност за неинвазивно и бързо поставяне на диагнозата (Yang et al., 2018). Javaid et al. доказват, че покачването на слюнчените нива на сърдечния биомаркер тропонин (сTn) при ОМИ корелира със серумните му нива и утвърждава възможността за употреба на слюнката като допълнителен неинвазивен биологичен материал за диагностиката на това спешно състояние (Javaid et al., 2016). Установени са и повишени стойности на hsCRP, възпалителни цитокини IL-1 β , IL-6, TNF- α и простагландин E2 в слюнка при атеросклероза, което дава допълнителна възможност за оценка нестабилността на атероматозната плака (Yang et al., 2018).

4.6. Бъбречни заболявания

В различни изследвания (Walt et al., 2007; Arregger et al., 2008) се установява, че многобройни слюнчени съставки (кортизол, нитрит, пикочна киселина, натрий, хлорид, рН, амилаза и лактоферин) се откриват в повишени концентрации при бъбречни заболявания в краен стадий и част от са предложени като слюнчени биомаркери за оценка ефективността на хемодиализата. Успешно се използват концентрациите на слюнчените фосфати, като клиничен маркер, отразяващи хиперфосфатемията, чийто принос за сърдечно-съдовата калцификация при хронична бъбречна недостатъчност е

доказан. Освен това, е установено че фосфатните нива в слюнка корелират положително със серумния креатинин и скоростта на гломерулната филтрация (Savica et al., 2008).

4.7. Ендокринни заболявания

Известно е от преди повече от 30 години, че стероидните хормони се откриват и в слюнката, при това в свободно, несвързано с белтъци-преносители състояние. Развитието на технологиите през последните две десетилетия направи възможно стандартизирането на хормоналния анализ в оралната течност и използването му като част от оценката на ендокринната функция (Kaufman and Lamst, 2002; Gröschl, 2009). Към настоящия момент слюнката намира все по-широко приложение за определяне не само на кортизол, кортизон и тестостерон, но и на алдостерон, дехидроепиандростерон, естрадиол, естриол, прогестерон и др. Слюнката, като неинвазивно взет биологичен материал, придобива все по-голяма популярност при скрининг на синдрома на Кушинг, при диагностика и проследяване на първичен алдостеронизъм, при оценката на психо-емоционалния стрес и поведение, при нормалното сексуално развитие в детска и юношеска възраст и/или установяване функцията на яйчниците и фертилността на жената (Pandey et al., 2014). Освен това предимствата на слюнката като биологичен материал, който може да се вземе извън лабораторията от немедицински персонал, дава възможност за употреба РОСТ тест, одобрен от FDA, за проследяване на фертилния цикъл при жената, както и за оценка на риска от преждевременно раждане (Mittal et al., 2011).

4.8. Употреба на слюнката в токсикологията

Слюнката е удобен и надежден неинвазивен инструмент за скрининг на зависимост от упойващи и наркотични вещества. Към настоящия момент тази ѝ употреба се явява вече утвърдена в рутинната практика. Използва се за качествен анализ на никотин, канабиноиди, кокаин, фенциклидин, диетиламид на лизергинова киселина, марихуана, опиоиди, барбитурати, диазепини, амфетамини и етанол. Тестове, базирани на експресно определяне в слюнка на най-често използваните наркотични вещества и етанол се използват от правозащитните органи за установяване на употребата им, както и в спешните отделения за етиологична причина при коматозни състояния и интоксикации (Drummer 2006).

4.9. Употреба на слюнката в съдебната медицина

Слюнката е утвърден биологичен материал за изследване в областта на съдебната медицина. Наличието на високи стойности на алфа-амилаза, които могат да бъдат

установени чрез имунохроматографска тест-лента, идентифицира бързо един биологичен материал като слюнка (Lima et al., 2011). Получена от различни предмети и повърхности (белези от ухапвания, оставени върху предмети или жертви на насилие, цигари, пощенски марки, чаши), слюнката се използва широко в криминалните разследвания и служи за идентификация на индивидите посредством кръвно груповите антигени (А, В, Н и Lewis) или ДНК анализ. Клетките в устната кухина, особено букалните, са добър източник за извличане и изследване на ДНК (Chatterjee, 2019).

4.10. Гастро-интестинални заболявания

Слюнката може да е полезен биологичен материал за изследване при различни заболявания ГИТ. Има данни, че при пациенти със стомашна язва и хроничен гастрит в слюнката може да се открие ДНК на НР и да идентифицира инфекцията. (Zhang et al., 2016). Установената корелация между клирънс на кофеина в слюнката и чернодробните заболявания се яви като полезен и ефективен биохимичен параметър за оценка на остатъчната чернодробна функция. В основата на заболяването цьолиакия стои имунологичен феномен, свързан с непоносимост към белтъка глиадин, водещ до увреждане на лигавицата на тънкото черво. Количеството на антиглиадинови IgA антитела (IgA-AGA) и антитела срещу тъканната трансглутаминаза (tTG-Abs) са повишени в серума на пациенти с цьолиакия и техните нива корелират съответно със слюнчените. Диагностичната чувствителност и неинвазивността на процедурата за добиване на биологичния материал, дават предимство на саливарното изследване при скрининг и диагностика на това заболяване. Увеличението на слюнчената пероксидаза, албумин, TP, sIgA и амилаза също са установени при тези пациенти (Taaheri et al., 2014).

При УК и БК, като типични представители на хронично протичащо възпаление са описани по-високи нива на слюнчените цитокини и IgA и намаляване на лизоцим сравнение със здрави индивиди (Anjum, 2019).

Независимо от всички гореизброени факти, слюнката е все още слабо позната и използвана биологична матрица. В рутинната лабораторна практика тя често се игнорира както от лабораторните специалисти, така и от терапевтите по отношение на ролята ѝ за диагностичния процес и мониторирането на прогресията и тежестта на множество социално значими заболявания, включително и хроничните възпалителни заболявания на ГИТ.

5. Преданалитични правила за събиране, обработка и съхранение на биологичен материал

През 2004 г. Националният институт за дентални и краниофациални изследвания инициира и финансира мулти институционален и мултидисциплинарен изследователски консорциум с основна цел развитие на саливарната диагностика и употребата на слюнката като биологичен материал за оценка състоянието на здраве и болест (Kubala et al., 2018). Така през последното десетилетие слюнката, като "ултра-филтрат" на кръвта, се явява надеждна алтернатива на кръвната проба.

Използването ѝ като диагностичен инструмент е аналитично предизвикателство, свързано с високата вариабилност на биоактивните съединения в пробите, както и с липсата на установени референтни стойности за повечето рутинни лабораторни параметри. За всеки тестван слюнчен биомаркер с плазмен произход (получен посредством ултрафилтрация) се изисква висока степен на корелация между нивата му в слюнка и в плазма. Всички слюнчени биомаркери, произведени локално от жлезите и тъканите в устната кухина, като sIgA, лизозим, алфа-амилаза и др. са с ниски плазмени нива, липсва корелация между нивата им в слюнка и плазма и би трябвало да бъдат изследвани единствено в слюнката (Chiappin et al., 2007).

Пробовземането е първият и особено важен етап от аналитичния процес. То се определя от два основни фактора:

- вид на слюнката – цяла или слюнка, отделена от специфични жлези, напр. от паротидните. Цялата слюнка е смес от секретирания се от жлезите и отделящ се в устната кухина секрет, както и други компоненти (назален секрет, хранителни остатъци, слъзи, бактерии и гингивална кревикуларна течност) и се характеризира с висок вискозитет. Секрецията от специфична слюнчена жлеза се изследва с цел оценка на функционалното ѝ състояние, но методиката ѝ на получаване е трудоемка и инвазивна, а информативната ѝ стойност значително ограничена спрямо тази, получена от цяла слюнка;
- начин на събиране на слюнката – със или без стимулация. Нестимулираната слюнка се счита за неутрална проба, носеща информация за всеки един фактор, отговорен за образуването на слюнката и поддържането на нейната хомеостаза, а не само за активността на слюнчените жлези (Martí-Álamo et al., 2012). Стимулираната слюнка се постига с химични или механични стимуланти. Тя се предпочита при изследване на маркери с плазмен произход (например миоглобин, С-реактивен протеин,

откриване на туморни биомаркери). Използването на стимуланти могат допълнително да интерферират лабораторния резултат (например парафилм, лимонена киселина), което довежда до различия в резултатите от двата типа слюнка. При стимулация по-голямата част от произведената слюнка се извлича предимно от паротидната жлеза (Mohamed et al., 2012).

Техниката на вземане на проби от слюнка е един от най-съществените източници на грешки, влияещи върху крайния резултат. За събиране на проби от цяла слюнка най-често се прилагат основно два добре документирани метода – пасивно отделяне и техника с абсорбиращо устройство. В търговската мрежа се предлагат разнообразни пособия за събиране на оралната течност, предназначени за различни възрасти (дори за кърмачета и малки деца). Те са направени от полипропилен, не адсорбират протеинни молекули и са криостабилни (Salimetrics 2015 3rd Edition). В зависимост от анализа, който ще се определя, тези саливарни пособия могат да бъдат без и с абсорбиращи тампони (памук, инертен полимер). В литературата има редица проучвания за влиянието на добавките за отделяне на нестимулирана слюнка или стимулантите за добив на стимулирана слюнка върху стабилността и концентрацията на различни анализи (Nunes et al., 2015).

За да се преодолее биологичната вариация, от изключително значение е стандартизацията на процедурата за събиране на проби от слюнка. За целта трябва да се съобразят циркадните ритми на слюнообразуването и да се елиминира влиянието на оралните стимуланти като различни видове храни и пиетата, психически стрес, както и употребата на орални хигиенни средства преди събирането на пробите. Важно е да се почисти устната кухина като се отстранят десквамираните епителни клетки, микроорганизмите и остатъците от храната чрез неколккратно изплакване с дестилирана вода (Martí-Álamo et al., 2012).

С цел минимизиране на промени в клетъчния и биохимичен състав на слюнката се препоръчва незабавна обработка на пробата – центрофугиране, отделяне на супернатанта и съхранение на аликвотите при -20°C , а седиментът – да се ресуспендира в еквивалентно количество физиологичен разтвор (Xie et al., 2008).

Най-често се използва пасивен метод за добиване на цяла нестимулирана слюнка, наричана още "смесена" слюнка. Чрез проста и бърза процедура, изискваща минимално оборудване, се обезпечават цялостността на пробата, необходима за биологичното

тестване. Този пасивен метод се счита за златен стандарт, осигуряващ качествен материал за изследване (Martí-Álamo et al., 2012).

6. Изводи от литературния обзор

Устната кухина и отделяната орална течност са неразделна част от храносмилателната система, имат общ филогенетичен и морфо-функционален произход и строеж. Единна невро-хуморална регулация е характерна за физиологичните процеси както в устната кухина, така и в целия ГИТ. Слюнката има не само важна дигестивна функция, но осъществява съществена протективна роля за ГИТ. Буферният капацитет, оралната микробиална екосистема, образуването на нитрити и естествени антимикробиални протеини са част от защитните механизми на слюнката за целия ГИТ.

Слюнката не е рутинно използван в лабораторията биологичен материал и за употребата ѝ в клиничната практика е необходимо стандартизиране на преданалитичните изисквания. Видът на слюнката, методът на събиране и обработка на биологичният материал са критични за надежността на лабораторните резултати. В литературата има противоречиви данни относно вариациите на слюнчените анализи в зависимост от пол, възраст и въздействие на различни екзогенни фактори.

В литературата липсват данни за референтните граници на редица биохимични показатели и клетъчните елементи в слюнката. За някои от тях се откриват твърде различни диапазони на референтния интервал, зависещ както от нестандартизираното събиране на слюнка, така и от методите, с които се определят съответните анализи.

В литературата има недостатъчни данни за корелационните взаимоотношения между нивата на редица показатели (общ белтък, албумин, различни ензими и субстрати) в серум и слюнка както в състояние на здраве, така и при различни хронични заболявания, включително и тези, засягащи ГИТ. Липсва информация в каква посока и степен се променят саливарните стойности на изследваните показатели в зависимост от активността и тежестта на патологичния процес.

Не са открити проучвания, предоставящи информация за промени в клетъчния състав на слюнката, при хронични заболявания на ГИТ. Липсва отговор на въпроса възможна ли е корелация между промяната в клетъчния състав и активността на възпалителния процес.

В литературата няма достатъчно данни за нивата на саливарния sIgA при хронични възпалителни състояния на стомашно-чревния тракт (болестта на Крон, улцерозен колит,

гастрити). Не са добре изяснени промените в стойностите му според активността на процеса, както и корелационните отношения между серумните нива на IgA и слюнчените нива на sIgA.

Независимо, че широко се обсъждат имунологичните патогенетични механизми при ХВЧЗ, съществуват единични изследвания, в които се откриват противоречиви данни за ролята на серумния ензим ADA, като имунологичен маркер за активирани Т клетки, и промяната му в зависимост от активността и стадия на заболяването.

Друг съществен патогенетичен механизъм при заболяванията на ГИТ е нитрозативния и оксидативен стрес. Проучванията относно нивата на нитрат/нитрит в слюнка и тяхната взаимовръзка с основни характеристики на ХВЧЗ и хронични гастрити все още са твърде оскъдни. Не са достатъчно изследвани показателите на оксидативния стрес и антиоксидантния капацитет в двата биологични материала (серум и слюнка) при заболявания на ГИТ и взаимовръзката им с хода на болестния процес.

Независимо от всички гореизброени факти, слюнката е все още слабо позната и използвана биологична матрица. В рутинната лабораторна практика тя често се игнорира както от лабораторните специалисти, така и от терапевтите по отношение на ролята ѝ за диагностичния процес и мониторирането на прогресията и тежестта на множество социално значими заболявания, включително и хроничните възпалителни заболявания на ГИТ.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

От така формулираната цел произтичат следните задачи:

- 1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрени биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка:**
 - 1.1. Разработване правила за събиране, обработка и съхранение на оралната течност, съобразени с преданалитичните изисквания.**
 - 1.2. Оптимизиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрени биохимични показатели в слюнка:**
 - 1.1.1. Валидиране на dROMs тест – метод за определяне на реактивни кислородни форми (ROS)
 - 1.1.2. Валидиране на SAT тест – метод за определяне на антиоксидантния капацитет (AOC) на слюнката
 - 1.1.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин А (sIgA)
 - 1.1.4. Валидиране на метод за изследване на нитрити в слюнка
- 2. Проучване на биологичните вариации на подобрени биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтния им интервал:**
 - 2.1. Биохимични показатели – пикочна киселина (UA), общ белтък (TP), албумин (ALB), алфа-амилаза (sAA), лактат дехидрогеназа (LDH), нитрити и секреторен IgA (sIgA).**
 - 2.2. Клетъчни елементи – еритроцити (RBC), левкоцити (WBC), епителни клетки (EC) и бактерии.**
- 3. Проучване на биологичната вариация и определяне на референтния интервал на маркери, оценяващи оксидативния стрес в слюнка и серум от здрави лица**
- 4. Проучване на корелативни връзки между изследваните слюнчени и серумни показатели**

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

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица:

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

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

Групата на болните лица (114 пациента) е формирана от пациенти, хоспитализирани в гастроентерологичните отделения на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и ВМА – МБАЛ – Варна по повод обостряне на заболяването (ХВЧЗ и хроничен гастрит) или за рутинно мониториране хода на заболяването. Диагностицирането е извършено по стандартните критерии от специалистите в съответните клиники.

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

- пациенти над 18 годишна възраст с клинично, хистологично и ендоскопски потвърдена диагноза за следните заболявания: болест на Крон (БК), улцерозен колит (УК), хроничен гастрит
- пациенти с активирани заболявания, включително субективни оплаквания, както и пациенти в ремисия или с лека форма на заболяването (за ХВЧЗ)
- пациенти с хронични гастрити и доказани антитела за НР и антигенно присъствие във фекална маса
- пациенти, подписали информирано съгласие за извършване на ендоскопско изследване с взимане на биопсични проби, както и съгласие за взимане на биологичен материал – кръв, фекални проби и слюнка

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

- наличие на локално възпаление в устната кухина
- не са имали стоматологични манипулации в рамките на 48-72 часа, предхождащи вземането на биологичния материал
- наличие на тежки съпътстващи хронични физически и психични заболявания
- наличие на злокачествено усложнение и/или скорошна хирургическа интервенция
- не са употребявали алкохол и цигари два часа преди изследването

Групата на здравите доброволци (186 индивида) е формирана от преминаващи годишни профилактични прегледи лица към ВМА – МБАЛ – Варна, дали съгласие за участие в проучването и без данни за стомашно-чревни или извънчревни тежки придружаващи заболявания.

Използвани са следните критерии за включване на здравите доброволци в научното проучване:

- лица без отклонение в скрининговите лабораторни изследвания (ПКК, биохимични показатели и урина)
- липса на други възпалителни заболявания (основен критерий – CRP в референтни граници)
- нормален стоматологичен статус

Критерии за изключване на здравите доброволци от участие в научното проучване:

- наличие на тежки съпътстващи хронични физически и психични заболявания
- не са подлежали на стоматологични манипулации в рамките на 48-72 часа, предхождащи вземането на биологичния материал
- не са употребявали алкохол и цигари два часа преди изследването
- поне 10 дни преди вземане на биологичните проби не са били на терапия с антибиотици или НСПВС

На таблица 1 са представени демографските и клиничните характеристики на включените в проучването лица.

Таблица 1. Демографски и клинични характеристики на изследваните групи лица

Изследвани групи лица	Брой (n)	Средна възраст (mean±SD)	Жени n (%)	Мъже n (%)
Пациенти с ХВЧЗ:	54	45.9±14.7	30 (55.6%)	24 (44.4%)
• болест на Крон	14	36.9±7.9	9 (16.6%)	5 (9.3%)
• улцерозен колит	40	49.1±15.3	21(38.9%)	19 (35.1%)
Пациенти с хронични гастрити:	60	58.7±12.1	23 (38.3%)	37 (61.7%)
• <i>HP</i> положителни	44	56.6±12.1	17 (28.3%)	27 (45.0%)
• <i>HP</i> отрицателни	16	60.8±10.1	6 (10.0%)	10 (16.7%)
Общ брой пациенти	114	52.3±15.22	53 (46.5%)	61(53.5%)
Здрави лица (контролна група)	186	41.6±8.91	81 (43.6%)	105 (56.4%)

2. Биологични материали

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

2.1. Кръв

Кръвните проби са взети в подходящите за целта сертифицирани вакутейнери – с антикоагулант K₂EDTA – за изследване на хематологични показатели; с антикоагулант Na citrate – за определяне скоростта на утаяване на еритроцитите (СУЕ); без антикоагулант с гел сепаратор – за изследване на биохимичните показатели в серум. Серумният вакутейнер се центрофугира за 10 минути при 3500 rpm и отделеният кръвен серум, разпределен в няколко аликвоти се изработва веднага или съхранява при -20°C до момента на изследването.

2.2. Нестимулирана слюнка

Процедурата по събиране на слюнчената проба е съобразена с преданалитичните изисквания и циркадни вариации. Събраната слюнка (2-3 мл.) се центрофугира при 2500

грм, на стайна температура, за 5 мин. и надутаечната течност се използва за определяне на биохимичните показатели, а седиментът – за определяне на клетъчните елементи.

2.3. Фекална маса

Фекалната проба се предоставя в специални за целта контейнери, обработка се според инструкциите на търговските китове и се изследва в рамките на деня на получаване на биологичния материал.

3. Методи на изследване

3.1. Изследване на лабораторни показатели във венозна кръв

3.1.1. Хематологични показатели

3.1.1.1. Кръвна картина

С помощта на проточно флоуцитометрично изследване на хематологичен анализатор Sysmex XN1000 (Japan) са изследвани следните показатели: WBC и диференциално броене на левкоцитите, тромбоцити (PLT), RBC, хематокрит (Hct), хемоглобин (Hb) и еритроцитни индекси.

3.1.1.2. Скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ)

СУЕ се определя автоматично на апарат Sedi 15 (Becton Dickinson, USA).

3.1.2. Биохимични показатели

3.1.2.1. Рутинни тестове

Рутинните биохимични показатели, влизащи в диагностичния пакет за съответните заболявания, са определени чрез стандартизирани методи, препоръчвани от Международната федерация по клинична химия и лабораторна медицина (IFCC). Изследванията са осъществени с реактиви на Beckman Coulter (USA), BioSystems S. A. (Spain) и Thermo Scientific на биохимични анализатори Olympus AU 640 и Indiko Plus USA. Изследваните лабораторни показатели в серума и методите, използвани за тяхното определяне са представени на таблица 2.

Таблица 2. Биохимични параметри, изследвани в серум.

Показател	Метод	Мерни единици
α-Amylase	Кинетичен колориметричен метод (EPS*), оптимизиран по IFCC	U/L
LDH	Кинетичен UV метод, оптимизиран по IFCC	U/L
UA	Ензимен колориметричен тест (уриказа-перокси-даза)	$\mu\text{mol/L}$
TP	Биуретов колориметричен метод	g/L
ALB	Колориметричен метод с бром крезолово зелено	g/L
CRP	Имунотурбидиметричен метод	mg/L
Серумно желязо	TPTZ** метод	$\mu\text{mol/L}$
IgA	Имунотурбидиметричен метод	g/L
ADA	Кинетичен UV метод, (BioSystems S. A. Spain)	U/L

*EPS – Ethylidene-p-nitrophenyl -G7 субстрат

**TPTZ – Tripyridyl -S-Triazine

3.1.2.2. Определяне на показатели на оксидативен стрес:

- d-ROMs тест (Diacron International, Italy)

d-ROMs (Reactive oxygen metabolites) е кинетичен колориметричен тест, който служи за оценка на оксидативния стрес чрез определяне концентрацията на реактивни кислородни форми (ROS) и по-специално хидропероксиди (ROOH). Биологичната проба се смесва с буфер с $\text{pH} < 7$. Под действие на киселото рН от плазмените протеини се освобождава желязо, което по реакцията на Fenton катализира разпадането на хидропероксидите, генерирайки нови радикални видове, като пероксилни (ROO*) и алкоксилни (RO*) радикали. Те окисляват хромоген от реактива (ароматен амин – N, N-диетилпарафенилендиамин) като се получава продукт с розов цвят и абсорбционен максимум при $\lambda = 505\text{nm}$. Стойността на отчетената абсорбция е пропорционална на концентрацията на реактивните кислородни форми от пробата. Резултатът се изразява като Carratelli Units (1 UCARR=0.08 mg% разтвор на водороден пероксид). По данни на производителя стойностите при здрави лица варират между 250 и 300 UCARR. Определянето на dROMs е извършено на полуавтоматичен спектрофотометър Free Care diem по оригинална програма на фирмата-производител на кита, като контролът на

анализа е осъществен с два вида контролни материали – в ниската област (160 ± 16 UCARR) и във високата област (410 ± 41 UCARR). Тестът е валидиран от производителя чрез сравнение с метод, считан за златен стандарт при определяне на свободни радикали и основан на електронно-парамагнитна резонансна спектроскопия (ESR/EPR).

- ВАР тест (Diacron International, Italy)

ВАР тестът (Biological antioxidant potential) е предназначен за определяне на общия антиоксидантен потенциал на плазмата, измерващ общата концентрация на антиоксиданти в кръвта като билирубин, пикочна киселина, витамин С, протеини и др., способни да редуцират желязото от ферри йони (Fe^{3+}) до феро йони (Fe^{2+}). Антиоксидантите, съдържащи се в кръвната плазма обезцветяват хромогена, съдържащ железен хлорид и тиоцианат при $\lambda=505$ nm. Степента на обезцветяването е пропорционална на редуциращата способност на антиоксидантите, съдържащи се в плазмата. Калибраторът и контролите, предложени от производителя, съдържат като редуциращ желязото агент Vitamin С. Резултатите се изразяват в $\mu\text{mol/L}$. По данни на производителя стойностите при здрави лица са над 2200 $\mu\text{mol/L}$. Определянето на антиоксидантния капацитет е извършено на полуавтоматичен спектрофотометър Free Care diem по оригинална програма на фирмата-производител на кита. Контролът на анализа е осъществен с подходящи контролни материали – в ниската област (940 ± 94 $\mu\text{mol/L}$ разтвор на Vitamin С) и във високата област (3000 ± 300 $\mu\text{mol/L}$ разтвор на Vitamin С).

3.1.2.3. Определяне на антитела срещу НР в серум

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

3.2. Изследване на лабораторни показатели в слюнка

3.2.1. рН и относително тегло (SG)

Измерването се осъществява посредством тест лента за урина на уринен анализатор Dirui H-500, China.

3.2.2. sIgA

Концентрацията на общия sIgA е определена с готов търговски кит на DiaMetra, Italy, чрез ензимен имуносорбентен анализ (ELISA). Китът е предназначен за изследване на слюнка, предварително разрежена 1:1000 със съответен буфер. Отчитането е

извършено на ELISA Strip Reader (Italy). Контролът на качеството е осъществен с помощта на контролен материал IgA saliva control 29 (DiaMetra, Italy) с прицелна стойност 75.3 (53.8÷113.7) mg/L. Тъй като не е рутинно използван метод, се наложи валидирането му като една от задачите в настоящия дисертационен труд.

3.2.2.1. Общ белтък и албумин (TP и ALB)

Важна особеност на параметрите TP и ALB е, че те са с твърде ниска концентрация в слюнката в сравнение със тези в серума. Това налага използването на чувствителни методи за определянето им. Анализът на TP и ALB е извършен на биохимичен анализатор Olympus AU 640 с реактиви на Beckman Coulter (Urinary/CSF Protein и Urine CSF albumin) и програми за уринен анализ, гарантиращи надеждното им количествено определяне, когато са в ниски концентрации.

3.2.3. Пикочна киселина (UA)

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

3.2.4. Слюнчена алфа-амилаза (sAA)

Активността на sAA е определена на биохимичен анализатор Indiko Plus (USA) с реактив на Thermo Scientific. Избра се този кинетичен-колориметричен метод, тъй като има широк линеен диапазон и възможност за автоматично разреждане (10-24000 U/L), значително по-голям от този за изследване на ензима с реактива на Wesman Coulter на Olympus AU 640 с помощта на уринна програма (20 – 4800 U/L).

3.2.5. LDH

Активността на ензима LDH е определена на биохимичен анализатор Indiko Plus (USA) с реактив на Thermo Scientific, оптимизиран по IFCC. Избран е този кинетичен UV метод, тъй като субстратът и кофакторът са в по-оптимални концентрации спрямо тези от реактива на Wesman Coulter за Olympus AU 640 по отношение на анализа в слюнката като биологичен материал за изследване.

3.2.6. Определяне на показатели на оксидативен стрес и антиоксидантна защита:

3.2.6.1. Нитрити

Изследването на нитритите в слюнка е осъществено с реактив Nanocolor Nitrite (MACHEREY-NAGEL, GmbH&Co.KG, Germany) на полуавтоматичен

спектрофотометър Free Carpe diem. Анализът се основава на способността на нитритите да взаимодействат с първични ароматни амини, образувайки оцветени диазосъединения. При взаимодействие с реактива на Griess (сулфанилова киселина и 1-нафтиламин) се получава розово оцветен комплекс с абсорбционен максимум при $\lambda=520\text{nm}$. Методът е разработен от производителя за определяне на нитрити в питейни води. Това налага валидирането му, когато се използва за определяне на нитрити в слюнка, една от задачите в настоящия дисертационен труд.

3.2.6.2. *d-ROMs test (Diacron International, Italy)*

Тестът е разработен и валидиран от производителя единствено за серум (виж стр. 14). Това налага валидирането му, когато се използва за определяне на реактивни кислородни форми в слюнка, една от задачите в настоящия дисертационен труд.

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

Определянето на антиоксидантния капацитет на слюнка е осъществено с кит SAT (H&D srl Parma, Italy) на полуавтоматичен спектрофотометър Free Carpe diem. SAT тестът се основава на същия принцип като този на ВАР теста за серум (стр. 15), но в състава на реагентите е добавена циркониева сол, свързваща фосфатите в слюнката. Това предотвратява значимата им интерференция в окислително-редукционните реакции. Контролът е осъществен с помощта на два контролни материала – в ниската област ($940\pm 94 \mu\text{mol/L}$ разтвор на Vitamin C) и във високата област ($3000\pm 300 \mu\text{mol/L}$ разтвор на Vitamin C). Тъй като не е рутинно използван метод, се наложи валидирането му като една от задачите в настоящия дисертационен труд.

3.2.7. Броене и диференциране на клетъчни елементи в слюнка

Броенето на клетки е осъществено с помощта на автоматичен уринен анализатор за седимент FUS-100 (Changchun DIRUI Industrial Co.,Ltd), Методът се основава на флоуцитометрично микроскопско високоскоростно заснемане на изображения за изброяване и идентификация на формените елементи в пробата. Образите на клетките от пробата се сравняват със заложената в софтуера на апарата база данни от образи на разнообразие от формени елементи и кристали и се класифицират според формата, строежа и размера, а според броя на изображенията се изчислява техния брой, изразен като брой/ μL . Морфологичните характеристики на различните клетъчни елементи, получени от автоматичния анализ, се верифицират и визуално. Особеността на слюнката като биологична проба, отличаваща я значимо от уринната проба е, че тя е с голям

вискозитет, поради наличие на муцинозни протеини. Това затруднява анализа и води до значими вариации в обема на аспирираната пробата. За да бъдат апаратно определени и диференцирани клетъчните елементи в слюнка е необходимо, пробата първо да се центрофугира, а утаеният седимент в последствие да се ресуспендира със съответен изотоничен буфер до първоначалното количество слюнка.

3.3. Изследване на лабораторни показатели във фецес

3.3.1. Фекален калпротектин (FC)

Количественото определяне на FC е осъществено с помощта на РОСТ системата, разработена от BÜHLMANN Laboratories AG, Switzerland, базирана на имунохроматографски принцип. РОСТ-методът е стандартизиран спрямо BÜHLMANN fCAL®ELISA метод, характеризиращ се с висока аналитична надеждност. Отчитането на резултатите е извършено на Quantum Blue®Reader, BÜHLMANN. Използвани са и двата продукта, предлагани от производителя: Quantum Blue®fCAL, предназначен количествено да определя анализа в диапазона 30÷300 µg/g и Quantum Blue®fCAL High Range – за обхвата 100÷1800 µg/g.

За извличане на FC от пробата са спазвани стриктно инструкциите на производителя като е използвано предназначения за целта приспособление BÜHLMANN CALEX®Cap, което дава възможност стандартизирано да се екстрахира анализа от фекалната проба и да се сведат до минимум вариациите в обработката на биологичния материал.

3.3.2. Доказване на Helicobacter pylori (HP)

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

3.4. Статистически методи

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

- Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване
- Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и разсейване на данните

- Тест на Kolmogorov-Smirnov за определяне на типа на разпределението на данните в изследваните групи
- Параметричен Т-тест анализ за сравнение на средни величини на две независими извадки с Гаусово разпределение
- Непараметричен Тест на Mann-Whitney за сравнение на медиани на две независими извадки с не Гаусово разпределение
- Еднопосочен дисперсионен анализ (ANOVA) за установяване на статистически значими разлики между средни величини на повече от две независими (несвързани) групи
- Корелационен и еднофакторен регресионен анализ – за търсене на зависимост между два количествени признака
- Корелационен анализ на Pearson – за установяване на взаимовръзки между изследвани параметри, чиито резултати са Гаусово разпределени.
- Корелационен анализ на Spearman – за установяване на взаимовръзки между изследвани параметри, чиито резултати са не Гаусово разпределени.
- Графичен анализ – за визуализация на получените резултати
- ROC анализ – за оценка на диагностичната ефективност на изследваните биомаркери

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

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

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

Пробонабирането и техниката на вземане на проби от слюнка е първият и особено важен етап от аналитичния процес, през който е възможно да се допуснат съществени грешки, които да повлияят крайния резултат. След задълбочено проучване на литературните данни за целите на научното проучване се реши да се използва цяла нестимулирана слюнка.

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

Оралната течност се събира сутрин от 8 до 10 часа в специални стерилни полистиренови контейнери, градуирани и с конично дъно. Пет минути преди самото изследване устата се изплаква двукратно с физиологичен разтвор или трапезна/минерална вода посредством жабурене за 10 секунди. Спонтанно събраната в долната част на устната кухина слюнка (без изсмукване), чрез пасивно неколккратно отделяне се събира в контейнера до количество ($2\div 3$ ml) в рамките на 5-6 минути. Биологичните проби се центрофугират при стайна температура, 2500 rpm в продължение на 5 минути. Надстоящата течност внимателно се отпипетира и аликвотни количества от нея са поставени в микротейнери тип Епендорф, които до момента на определяне на биохимичните параметри, се съхраняват при температура -20°C .

Характерно свойство на слюнката е, че тя е хипотонична и клетъчните елементи в нея лесно се разрушават. Освен това тя изобилства от бактерии, в норма – от представители на комесалната микрофлора, а при патология се прибавят и патогенни микроорганизми. Всички те, в следствие на естествения си метаболизъм, водят до промяна на състава на слюнката. Това налага бърза обработката на пробите в рамките на $30\div 60$ минути след отделянето им, което е спазено стриктно в нашето проучване. По

градуирана скала на контейнера се отчита количеството събрана слюнка. След центрофугирането, отделеният седиментът се ресуспендира до първоначалното количество с дилуент на производителя (изотоничен буфер, Changchun DIRUI Industrial Co., Ltd) и броенето на клетките се осъществява веднага на автоматичен уринен анализатор за седимент FUS-100 (Changchun DIRUI Industrial Co., Ltd).

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

Някои от биохимичните показатели, определяни в слюнка, не са рутинно използвани в клинично-лабораторната практика, като за част от тях са използвани методи, предназначени за други биологични и небологични материали. Това наложи за целите на научното проучване методите за тези показатели да се оптимизират и валидират като се оцени аналитичната им надеждност.

1.2.1. Валидиране на d-ROMs тест – метод за определяне ROS

За определяне на реактивните кислородни форми (ROS) в слюнка е използван d-ROMs тест (Diacron International, Italy), предназначен за определяне на ROS в серум. Основание да се използва този тест като удачен за друг вид биологичен материал са редица научни изследвания, в които той успешно е прилаган за определяне на ROS в семенна течност от животински модели, урина, мононуклеарни клетки от периферна кръв др. (Constantini et al., 2016; Castellini et al. 2003; Ito et al. 2009; Bernabucci et al. 2011). Изследователите анализират показателя в съответните биологични материали като са спазили изискванията на производителя, без да има данни да са го валидирали преди употребата му.

Линейност на метода

Тъй като не открихме данни в литературата за линейния диапазон на метода в слюнка, се проведе изследване за нива на d-ROMs в сборна слюнка от 20 здрави лица и проби слюнка от 20 пациенти в тежка форма на заболяването, включени в проучването. При изследването на тези проби се установи, че стойностите на d-ROMs тест за слюнка варират в диапазона 50-100 UCARR, което е основание да проверим линейността на метода в диапазона от 30 до 300 UCARR.

За определяне линейността на метода в слюнка са използвани серия от специфични калибратори, изготвени с помощта на артифициална слюнка (Artificial saliva for medical and dental research, Pickering Laboratories, Inc. USA). За целта оригиналният калибратор

към кита е разтворен в 2 ml дейонизирана вода до крайна концентрация 300 UCARR. Поради големия вискозитет, артифициалната слюнка се наложи да бъде разреждана предварително с дейонизирана вода в съотношение 1:1. За построяването на калибрационната графика са използвани седем калибратора, получени чрез съответно разреждане на оригиналния калибратор с разрежданата артифициална слюнка, както е посочено на Таблица 3.

Таблица 3. Използвани специфични калибратори за определяне на d-ROM в слюнка

Специфичен калибратор	Калибратор (µl) [300 UCARR]	Артифициална слюнка 1:1 (µl)	Крайна концентрация [UCARR]
Калибратор 1	100	900	30
Калибратор 2	100	500	50
Калибратор 3	100	300	75
Калибратор 4	100	200	100
Калибратор 5	100	100	150
Калибратор 6	100	50	200
Калибратор 7	100	0	300

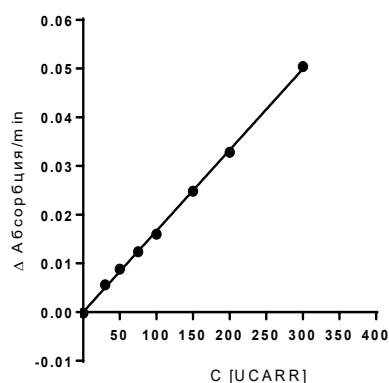
С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания при стриктно спазване на процедурата, указана от производителя, като получените съответни усреднени стойности на промяната в абсорбцията за минута (Δ Абсорбция/min) са посочени на таблица 4.

Таблица 4. Зависимост между концентрация на специфичните калибратори и промяната в абсорбцията за минута

Специфичен калибратор	Концентрация [UCARR]	Δ Abs/min
Калибратор 1	30	0.00560
Калибратор 2	50	0.00880
Калибратор 3	75	0.01240
Калибратор 4	100	0.01600
Калибратор 5	150	0.02480
Калибратор 6	200	0.03280
Калибратор 7	300	0.05040

Графичната зависимост между концентрацията на ROS и съответната Δ Abs/min (фиг. 4) се описва със следното регресионно уравнение: $y=0,0001663*x+8,632e-006$,

където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал (отчетената абсорбция). Коефициентът на корелация (r^2), мярка за линейността на метода е 0,9992.



Фигура 4. Калибрационна графика за определяне на ROS с помощта на d-ROMs тест

Откриваемият минимум (LOD) на d-ROMs е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби и наклона на калибровъчната графика (slope). LOD е изчислен по формулата: $LOD = \frac{3.3*SD}{slope}$, и е равен на 3,3 UCARR. Границата на количествено определяне (LOQ) се дефинира като сигнал, надвишаващ десетократно фоновият шум и възлиза на 9.9 UCARR.

Възпроизводимост и точност на метода

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода е използван контролен материал, предоставен от производителя – Low Control (Diacron International, Italy) с таргетна концентрация 160 UCARR, както и материал с двукратно по-ниска стойност, приготвен чрез разреждане 1:1 на гореспоменатия контролен материал с разредената артифициална слюнка, т.е. с таргетна концентрация 80 UCARR, попадащи в линейния диапазон на метода. Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни измервания за всяка от горепосочените концентрации. Възпроизводимостта от ден в ден е определена със същите контролни материали, измерени в рамките на 21 работни дни. Точността е оценена чрез размера на относителната грешка (D%). За оценка на аналитичния добив към Калибратор 4 с базисна концентрация 100 UCARR са добавени точно определени количества от стандарта (300 UCARR) и контролния материал във високата област (410 UCARR), предлагани от производителя (Diacron International, Italy), за да се получат крайни стандартни добавки с концентрации 50, 100 и 150 UCARR. Извършва се анализ на пробите преди и след съответната добавка, а аналитичният добив се изчислява като % от очакваните стойности.

Линейност на метода

По литературни данни (Benedetti et al., 2014), не сме открили стойности на SAT под 600 $\mu\text{mol/L}$ и над 2000 $\mu\text{mol/L}$, дори и при патологични състояния. По тази причина решихме да изследваме линейността на метода в диапазона от 380 $\mu\text{mol/L}$ до 3000 $\mu\text{mol/L}$. За целта са използвани серия от специфични калибратори, изготвени с помощта на разредена артифициална слюнка (Artificial saliva for medical and dental research) и оригинален калибратор от кита на производителя с таргетна концентрация 1900 $\mu\text{mol/L}$. Освен това е използван и допълнителен материал (High Control, Diacron International, Italy) с таргетна концентрация 3000 $\mu\text{mol/L}$ като калибратор, осигуряващ възможност да се провери линейността във високата концентрационна област. Така за построяването на калибрационната графика са използвани общо седем калибратора, както е посочено на Таблица 6.

Таблица 6. Използвани специфични калибратори

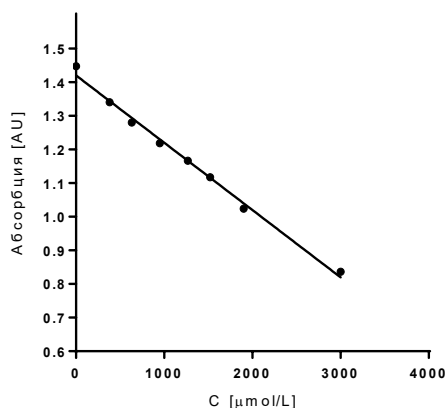
Специфичен калибратор	Калибратор (μl) [1900 $\mu\text{mol/L}$]	Артифициална слюнка 1:1 (μl)	Крайна концентрация [$\mu\text{mol/L}$]
Калибратор 1	100	400	380
Калибратор 2	100	200	633
Калибратор 3	100	100	950
Калибратор 4	100	50	1267
Калибратор 5	100	25	1520
Калибратор 6	100	0	1900
Калибратор 7	100	0	3000

С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания при стриктно спазване на процедурата, указана от производителя, като получените усреднени стойности на съответните абсорбции са посочени на таблица 7.

Таблица 7. Зависимост между концентрация на специфичните калибратори и абсорбцията.

Специфичен калибратор	Концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Абсорбция (AU)
Празна проба	0	1,4470
Калибратор 1	380	1,3400
Калибратор 2	633	1,2795
Калибратор 3	950	1,2110
Калибратор 4	1267	1,1665
Калибратор 5	1520	1,1170
Калибратор 6	1900	1,0240
Калибратор 7	3000	0,8360

Графичната зависимост между концентрацията на АОС и аналитичния сигнал е обратнопропорционална (фиг. 5) и е описана със следното регресионно уравнение: $y = -0,0002 * x + 1,42$, където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2), мярка за линейността на метода е 0,9937.



Фигура 5. Калибрационна графика за определяне на АОС с помощта на SAT теста

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

Възпроизводимост и точност на метода

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода са използвани два контролни материала (Diacron International, Italy) със съответни таргетни концентрации:

940 $\mu\text{mol/L}$ (Low Control) и 3000 $\mu\text{mol/L}$ (High Control), покриващи нормалната и патологична област. Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни измервания за всяка от горепосочените концентрации. Възпроизводимостта от ден в ден е определена със същите контролни материали, измерени в рамките на 21 работни дни. Точността е оценена чрез размера на относителната грешка (D%). За оценка на аналитичния добив към Калибратор 3 с базисна концентрация 950 $\mu\text{mol/l}$ са добавени точно определени количества от High Control (3000 $\mu\text{mol/l}$) предлаган от производителя (Diacron International, Italy), за да се получат крайни стандартни добавки с концентрации 500, 1000 и 1500 $\mu\text{mol/l}$. Извършва се анализ на пробите преди и след съответната добавка, а аналитичният добив се изчислява като % от очакваните стойности. Аналитичната надеждност на метода, оценена чрез възпроизводимостта, точността и аналитичния добив, е представена на Таблица 8 А, В, С, D.

Таблица 8 Аналитична надеждност на SAT тест в слюнка

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

A
B
C

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

D

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

Валидираният за целите на проучването метод SAT в слюнка показва RSD стойности за възпроизводимост и точност от 1.9% до 4.0%. В брошурата на теста не са упоменати характеристиките на аналитична надеждност, но в литературата са намерени данни за такива, които варират между 4,39% и 4,53% (Benedetti et al., 2014), т.е. нашите резултати съответстват на тези в литературата. В заключение може да се потвърди, че валидираният в аналитично отношение метод SAT в слюнка е с много добра аналитична надеждност, съпоставима с тази на утвърдените спектрофотометрични методи, рутинно използвани в клинично-лабораторната дейност.

3.2.3. Валидиране на метод за изследване на секреторен имуноглобулин IgA

Изследването на sIgA е осъществено при стриктно спазване инструкциите на производителя (DiaMetra, Italy) с готов търговски ELISA кит, предназначен и валидиран за слюнка.

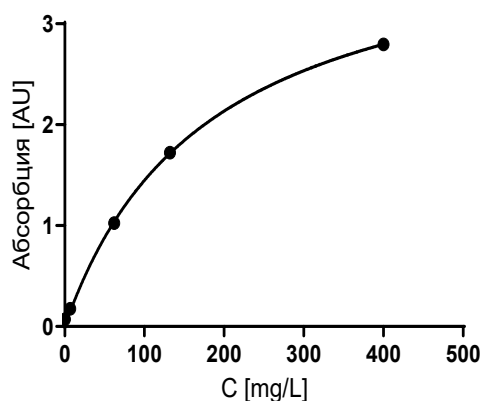
Линейност на метода

За определяне линейността на метода са използвани включени в кита серия от калибратори и сертифициран контролен материал, специфични за съответния лот. С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания, като получените усреднени стойности на съответните абсорбции са посочени на таблица 9.

Таблица 9. Зависимост между концентрация на специфичните калибратори и абсорбцията.

Специфичен калибратор	Концентрация [mg/L]	Абсорбция (AU)
Калибратор 1	0.0	0.071
Калибратор 2	6.9	0.177
Калибратор 3	62.0	1.025
Калибратор 4	132.0	1.723
Калибратор 5	400.0	2.796

Графичната зависимост между концентрация на sIgA и аналитичен сигнал (фиг. 6) се описва със следното нелинейно регресионно уравнение: $y=0.1514*x/(15.11+x)$, където x е концентрацията на съответния калибратор, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2) е 0.9988.



Фигура 6. Калибрационна графика за определяне на sIgA

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

Линейност на метода

За определяне линейността на метода е използван сертифициран стандарт воден разтвор на нитрити с таргетна концентрация 200 mg/L (VWR Rrolabo Chemicals, Belgium). За целите на проучването е избрано да се работи в мерни единици по SI системата, т.е. таргетната концентрация на стандарта е 4348 $\mu\text{mol/L}$, от който са приготвени серия специфични калибратори. Те са изготвени с матрица сборна слюнка (събрана от 20 здрави доброволци) и добавка на стандартен разтвор, покриващи концентрационен диапазон от 0 $\mu\text{mol/L}$ до 869 $\mu\text{mol/L}$, както е посочено на Таблица 11.

Таблица 11. Използвани специфични калибратори

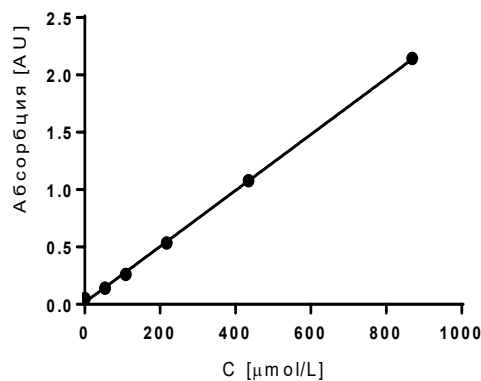
Специфичен калибратор	Калибратор (μl) 4348 [$\mu\text{mol/L}$]	Сборна слюнка(μl)	Крайна концентрация [$\mu\text{mol/L}$]
Калибратор 1	0	500	0.0
Калибратор 2	50	3950	54.0
Калибратор 3	50	1950	108.7
Калибратор 4	50	950	217.4
Калибратор 5	100	900	434.8
Калибратор 6	200	800	869.0

Избраните калибратори осигуряват изключително широк линеен диапазон 0÷869 $\mu\text{mol/L}$, който покрива както референтните, така и патологичните стойности. С всеки един от калибраторите са извършени по три паралелни измервания като получените усреднени стойности на съответните абсорбции са посочени на таблица 12.

Таблица 12. Зависимост между концентрация на специфичните калибратори и абсорбцията.

Специфичен калибратор	Концентрация [$\mu\text{mol/L}$]	Абсорбция (AU)
Калибратор 1	0.0	0.050
Калибратор 2	54.0	0.142
Калибратор 3	108.7	0.262
Калибратор 4	217.4	0.534
Калибратор 5	434.8	1.077
Калибратор 6	869.0	2.144

Графичната зависимост между концентрация на нитритите и аналитичния сигнал (фиг. 7) се описва със следното регресионно уравнение: $y=0,002441*x+0,01652$, където x е концентрацията на калибраторите, а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2) е 0.9994.



Фигура 7. Калибрационна графика за определяне на нитрити в слюнка

Откриваемият минимум (LOD) на нитрити е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби и наклона на калибровъчната графика (slope). LOD е изчислен по формулата: $LOD = \frac{3.3*SD}{slope}$, и е равен на 3.1 $\mu\text{mol/L}$. Границата на количествено определяне (LOQ) възлиза на 9.3 $\mu\text{mol/L}$.

Възпроизводимост и точност на метода

За оценка на възпроизводимостта и точността на метода също са изготвени контролни материали с матрица слюнка и добавяне на стандартен разтвор с крайни концентрации 58.7, 96.5, 144.8 и 217.4 $\mu\text{mol/L}$. Възпроизводимостта в серия е изследвана чрез измерване на относителното стандартно отклонение (RSD%) от 5 паралелни

*При оптимизирането и валидирането на методи за количествено определяне на sIgA, d-ROMs, SAT и нитрити в слюнка при нашите лабораторни условия са спазени всички изисквания на **Стандарт БДС EN ISO/IEC 17025**, спомагащ компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране на количествени лабораторни методи с цел подобряване възможността за генериране на валидни резултати. Изследваните аналитични характеристики на изредените по-горе методи съответстват напълно с изискванията на стандарта, с което се доказва тяхната висока аналитична надеждност. Това гарантира пригодността им за осигуряване на качествени и достоверни резултати за целите на настоящето научно проучване.*

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

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

2.1. Влияние на пол и възраст

Важните функции, които слюнката осъществява по отношение на цялостното човешко здраве, се обуславят от нейния качествен състав, както и от рН, вискозитета и буфериращата ѝ способност (Alshahrani et al., 2019). Всички фактори, които могат да повлияят върху скоростта на слюнчената секреция, съответно променят концентрацията на анализите в нея. Fenoll-Palomares и сътр. (2004), както и други литературни източници съобщават, че жените имат по-нисък слюнчен дебит, който може да се дължи, както на по-малкия обем на жлезите, така и на по-ниския индекс на телесна маса.

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

Изследваните слюнчени биохимични параметри и клетъчни елементи в различните възрастови декади са показани в Таблици 14 А и 14 В.

Таблица 14А. Възрастови вариации на биохимичните анализи в слюнка

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

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

Таблица 14В. Възрастови вариации на клетъчните елементи в слюнка

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

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

Влиянието на пола върху изследваните слюнчени биохимични параметри и клетъчни елементи е отразено в Таблици 15А и 15В

Таблица 15А. Полови вариации на биохимичните анализи в слюнка

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

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

Таблица 15В. Полови вариации на клетъчните елементи в слюнка

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

Сравнителният анализ е осъществено с помощта на Mann-Whitney test

Обсъждане на резултатите

Деца се раждат със стерилна устна кухина и още в първите дни от живота им, върху езика и устната лигавица се образуват комесални микробни общности, които играят роля при формиране на неспецифичния и специфичен лигавичен имунитет и поддържане на оралната хомеостаза. Секреторният IgA е почти неоткриваем при раждането и постепенно концентрациите му се повишават, като към 10-годишна възраст се приближават до тези на възрастните. Увеличението на sIgA в ранна детска възраст се обяснява с въвеждането на твърда храна, както и с поникване на зъбите (Weemaes et al., 2003). Jafarzadeh и сътр. (2010) докладват за значително по-високи нива на sIgA при лица на възраст 11÷20 години, в сравнение с тези от 1 до 10 години ($p<0.01$). Авторите установяват също, че средните стойности на sIgA нарастват плавно до 60-та година, след което леко намаляват в интервала 61÷70 години (Jafarzadeh et al., 2010, A) без тези различия да са статистически значими. Спадът в концентрацията на sIgA представлява рисков фактор за инфекция на горните дихателни пътища и храносмилателната система, особено при индивиди над 60 годишна възраст. В настоящото проучване не са включени деца, но резултатите ни показват също слабо изразена тенденция за постепенно покачване на концентрациите на sIgA в наблюдаваните четири възрастови групи, макар и различията помежду им да не са значими. Подобни данни за възрастови вариации докладват Weemaes и сътр. (2003), като те се свързват с промяна в скоростта на слюнчената секреция, която намалява с възрастта. Слюнчените жлези и оралният епител експресират рецептори за естрогени и за прогестерон, като е доказано хормоналното влияние върху скоростта на потока (в посока на намаление) и състава на слюнката (Valimaa et al., 2004). Женските полови хормони оказват влияние върху епителните клетки, като стимулират синтеза на секреторната компонента (SC), участваща във формирането на sIgA. Екипът на Gillum и сътр. (2014) установяват сигнификантно по-високи концентрации на sIgA при жените в сравнение с мъжете, като не откриват

съществена разлика в слюнчения дебит между двата пола и зависимост на секрецията от фазата на менструалния цикъл. Според Jafarzadeh и сътр. (2010), средните нива на sIgA са малко по-високи при жени въпреки, че разликите спрямо мъжете не са статистически значими. Нашите резултати показват сходна слаба тенденция с незначимо по-високи стойности на sIgA при жените. Вероятно по-ниската скорост на секреция с относително нарастване на белтъчните компоненти могат да обяснят получените резултати (Jafarzadeh et al., 2010, A).

Слюнчената α -амилаза (sAA) е често изследван ензим, свързан с оценка при интензивни спортни натоварвания и психологичен стрес, които индуцират секрецията ѝ в резултат на стимулирана симпатико-адренална система. Като биологични функции ензимът има не само дигестивно, но и антибактериално действие в устната кухина. Според Arhakis и сътр. (2013) при новородени концентрацията на sAA е изключително ниска, като тя нараства до нивата на възрастните с разширяване на хранителното меню през първите 3 години от живота. Yang и сътр. (2015) установяват статистически значими по-високи базални и стимулирани стойности на ензима при възрастните индивиди в сравнение с децата. Интересна особеност е, че най-голям пик в базалната секреция на ензима се открива при младите възрастни индивиди (18÷25 години) и при двата пола. С увеличаване на възрастта се появява тенденция нивата на sAA да спадат (Arhakis et al., 2013). Подобни наблюдения относно базалната секреция са установени и от Sahu и сътр. (2014), но авторите откриват, че при психологическа стимулация секрецията от паротидните жлези нараства приблизително 1.5 пъти и различията стават статистически значими. Nassar и сътр. (2014) не откриват значими различия в активността на sAA в младата възраст (20-30 год.) и тези намерени в по-напреднала възраст (60-80 год.), като нивата на ензима в младата възраст бележат по-високи стойности (Nassar et al., 2014). Тъй като изследвана група в настоящото проучване включва само възрастни индивиди, аналогично се наблюдава слаба тенденция за намаление на стойностите на sAA в нестимулирана слюнка с възрастта, като най-високи стойности са получени при най-младата група (20÷30 години). Известно е, че sAA се влияе силно от диетичния режим (Mandel and Breslin, 2012). Употребата на повече зърнени храни стимулира секрецията на ензима. Според нас, предпочитанието към бързия начин на хранене при младите хора с употребата на повече тестени изделия може да е причина за наблюдаваните незначимо по-високи стойности на sAA в тази възрастова група. Друга причина за намаляване на нивата на ензима е, че с възрастта активната ацинарна структура намалява, като тя се

замества със съединителна или мастна тъкан (Xu et al., 2019). Алфа-амилазата се секретира основно от най-големите слюнчени жлези (паротидните), поради което възрастовото им засягане води до намалените стойности на ензима с напредване на възрастта. По отношение на пола, наблюденията ни сочат отново слабо изразена тенденция за по-високи стойностите на sAA при мъжете в сравнение с тези на жените, което е в съгласие с установените от някои изследователски екипи резултати (Granger et al., 2007; Sahu et al., 2014). Гладуването и приемът на нисковъглеродни храни водят до намаляване на нивата на sAA. Общозвестен е фактът, че жените спазват по-често и по-стриктно диетични режими, което паралелно с по-малкия обем на жлезите би могло да обясни наблюдаваната от нас слаба тенденция за полови различия.

В литературата има редица съобщения, според които количествата на общия белтък (TP) и албумина (ALB) показват тенденция да се увеличават с възрастта, свързано с промяна на слюнчения дебит (Butler 1990). Тези промени стават статистически значими при възпалителни заболявания (Shaila et al., 2013). Това потвърждава серумния произход на ALB, който се явява серумен ултрафилтрат през гингивалния съдов плексус на креникуларните процеди. По тази причина слюнченият ALB се налага като подходящ биомаркер в стоматологичната практика при диагностиката на пародонтозата (Shaila et al., 2013; Pushpass et al., 2019). При изследване на здрави индивиди Vasu и сътр. (1984) не откриват статистически значими различия в стойностите на TP и ALB. Подобна тенденция за нарастване на стойностите с възрастта, макар и статистически незначима, се установява и в нашето проучване. Предполага се, че тези леки възрастови промени по-скоро са свързани със зъбния статус. Така например Shaila и съавт. (2013) установяват 5 до 6 пъти по-нисък саливарен албумин при беззъби индивиди. Полът не оказва съществено влияние върху стойностите на TP и ALB както в нашето проучване, така и в други проучвания (Shaila et al., 2013).

Редица проучвания показват, че пикочната киселина (UA) в слюнка не се променя съществено с възрастта (Riis et al., 2018; Bel'skaya et al. 2020). Противоречиви са данните относно вариации на показателя според пола. Bel'skaya и сътр. (2020) намират по-високи стойности при мъже отколкото при жени, но тези различия не са статистически значими, докато Riis и сътр. (2018) откриват значително по-високи средни нива на показателя при мъжете, като трябва да се има предвид, че изследваната от тях група е съставена предимно от млади индивиди на средна възраст $23,8 \pm 4,6$ години. Интересен е фактът, че индексът на телесната маса (BMI) е положително свързан с нивата на UA, както и че

острият и хроничен психосоциален стрес се свързват с повишените ѝ нива (Corey-Bloom et al., 2020; Martínez et al., 2017). При нашата контролна група не се установяват разлики, както при различните възрастови групи, така и при двата пола. Наблюдаваната несъществена и леко очертана тенденция към покачване на стойностите на UA с възрастта би могла да се обясни, както с нарастващия ВМІ с възрастта, така и с настъпващи адаптивни процеси по отношение на редица промени в устната кухина. Вероятно е UA при тези обстоятелства (механично въздействие на различни дентални материали, ефект от вредни навици, като тютюнопушене и употреба на алкохол и хронични възпалителни процеси) да проявява защитни свойства като основен неензимен антиоксидант в слюнката. По отношение на пола нашите данни са сходни с тези на Bel'skaaya и сътр. (2020) и се отличават от тези на Riis и сътр. (2018). Лицата, включени в нашето проучване, покриват широк възрастов диапазон, подобно на проучването на Bel'skaaya и за разлика от това на Riis. Вероятно е с нарастване на възрастта половите различия да се заличават.

Съставът на устната микрофлора варира в зависимост от възрастта на гостоприемника. Промени в оралния микробиом често са резултат от растежа на зъбите, промени в хранителните навици, хормонални влияния, нарушения в слюнчения поток или в имунната система (Sharma et al., 2018). При лоша устна хигиена повишеното количество бактерии води до инфилтрация на макрофаги в устната мукоза и стимулира производството на нитрити от постъпващите с храната нитрати. Нашите резултати показват нарастващи стойности на нитрити в слюнка с възрастта. Интересно е, че още във втората възрастова група се установява почти двукратно увеличение на нивата, макар и все още статистически незначимо, вероятно поради по-големите девиации в стойностите. Най-високи концентрации на нитритите се установяват при лицата от последната възрастова група, като различията спрямо тези от първа декада са сигнификантни (тест One way ANOVA с корекция на Bonferroni $p=0,0281$). Подобни данни са докладвани от Mirvish и сътр. (2000), които установяват, че при възрастни мъже има значително по-високи нива на нитрити в сравнение със съответните по-млади индивиди.

Левкоцитите (WBC) мигрират през кревикуларните цепнатини към устната кухина по пасивен или активен механизъм. Редица автори установяват вариации в броя на WBC в слюнката, свързани с възрастта и наличието на промени в съзъбието. Така например Rijkschroeff и сътр. (2017) намират по-нисък брой орални полиморфонуклеарни клетки

(oPMN) и по-висок процент на апоптотични/некротични oPMN в 1 mL нестимулирана слюнка при беззъби лица в сравнение с такива със зъби. Това наблюдение касае предимно деца в кърмаческа възраст, преди поникването на зъбите и хора в напреднала възраст, с тотални протези. Тъй като в изследваната от нас контролна група отсъстват подобни субекти, не са отчетени сигнификантни различия в броя на WBC в различните възрастови групи.

Според повечето автори възрастта не оказва особено влияние върху количеството на епителните клетки (EC) в слюнката (Coorman et al., 2014; Theda et al., 2018). Последните са установили, че средният брой на EC в устна кухина при деца (средна възраст 6.7 год.) е с 23% по-висок в сравнение с тези при възрастни индивиди (25-59 год.), като тези различия са статистически значими ($p=0.02$). Недостатък на изследването е, че тези резултати са въз основа на малобройни групи (16 деца и 12 възрастни). В настоящото проучване се наблюдава тенденция за увеличаване на EC в различните възрастови групи, като се установява посредством тест One way ANOVA с корекция на Bonferroni статистически значима разлика ($p=0.0453$) в броя им между младите възрастни (20-30 г.) спрямо индивидите от четвъртата група (50-64 г.). По всяка вероятност механични фактори (зъбни коронки, мостове), водещи до микронараняване, както и вредни навици (тютюнопушене и алкохол) биха могли да обяснят тези различия.

В настоящето проучване по отношение на еритроцитите (RBC), в слюнка от здрави индивиди, не се установяват сигнификантни различия в отделните възрастови групи. В научната литература съществуват оскъдни данни относно стойностите на RBC в слюнка и вариацията им според възрастта и пола при здрави индивиди. Ars и сътр. (2002) и Coorman и сътр. (2014) определят броя на клетъчните елементи с автоматичен анализатор в стимулирана слюнка. Освен типа слюнка има различие и в изследваната кохорта индивиди, които са в добро общо здраве, но се оказва, че известен процент от тях са с недобро орално здраве (например наличие на гингивит). Това определено затруднява сравнението на техните резултати с нашите.

Бактериите са най-представителната група, многократно надвишаваща останалите видове клетки в устната кухина дори и при състояние на добро орално здраве. Нашето проучване установи статистически значимо увеличение на бактериите с възрастта ($p=0.0234$), като при сравнението между отделните групи посредством One way ANOVA с корекция на Bonferroni също се намери сигнификантно различие между индивидите от първа група спрямо тези от трета и четвърта (съответно $p=0.0177$ и $p=0.006$). Това

вероятно се дължи на променения стоматологичен статус с нарастване на възрастта (наличие на чужди тела като коронки, мостове, частични протези), които създават условия за натрупване на хранителни остатъци и благоприятна среда за бактериалната колонизация.

Що се касае до пола, Ars и сътр. (2002) намират значително по-високи стойности в броя на RBC, EC и бактериите при мъжете в сравнение с жените при изследването им в стимулирана слюнка. Много изследвания показват, че устната лигавица е чувствителна към ефекта на женските полови хормони (Gillum и сътр., 2014). Различни периоди в живота на жената, като пубертет, бременност и менопауза, свързани с промените в хормоналния ѝ статус, се отразяват с изменения в устната лигавица (Dhaliwal et al., 2015). Оралният епител притежава хормонални рецептори и се влияе от фазите на цикъла при жените в репродуктивна възраст. Още през 1948 година Ziskin and Moulton разкриват добре изразени ритмични промени в епителните клетки на устната кухина, съвпадащи с промените, открити във вагиналните намазки (Ziskin and Moulton, 1948). Получените от нас данни показват липса на полови различия относно броя на различните видове клетки. Вероятна причина за това, би могло да бъде и фактът, че изследваната група жени не е еднородна, а включва жени в репродуктивна възраст, в перименопауза и такива в менопауза. В допълнение може да се изтъкне и фактът, че вземането на слюнка от менструиращи жени не е съобразено с месечния им цикъл. Въпреки съвсем малката и незначима разлика в епителните клетки при жените спрямо мъжете (525.66 ± 214.1 cells/ μ l vs 493.18 ± 142.3 cells/ μ l), тя корелира с установените от нас леко завишени стойности на LDH, тъй като нормалното излющване и некроза на оралния сквамозен епител се явяват основен източник на ензима в саливарната течност.

2.2. Влияние на тютюнопушенето

Тютюнопушенето е разпространен вреден навик и доказан рисков фактор за редица възпалителни и злокачествени заболявания, засягащи не само тъканите и органите в устната кухина, но така също и на дихателната и храносмилателната системи. Редица доказателствата сочат, че тютюнопушенето е един от екзогенните фактори, които намаляват отделянето на слюнка и променят състава ѝ (Nunes et al., 2015). Този рисков фактор действа механично, химично и термично на лигавицата на устната кухина, като стимулира слюнчените жлези и води първоначално до краткотрайно увеличена секреция на слюнка (Bafghi et al, 2015). Химическата стимулация се обяснява с въздействието на никотина върху никотиновите рецептори като агонисти, които повишават слюноотделянето (Buduneli,

2012). В дългосрочен аспект, обаче, е установено, че тютюнопушенето намалява слюнчената секреция, като първата жлеза, която се засяга е паротидната. Загубената част от функцията ѝ се компенсира от субмандибуларните и сублингвалните жлези, които отделят муцинозна слюнка (Petrušić et al., 2015). Слюнката е първият флуид, с който цигареният дим влиза в пряк контакт. Той съдържа над 4000 различни химични съединения, от които 400 са доказани канцерогени – ароматни амини, нитрозамини, оксиданти (ROS), радиоактивни елементи (^{210}Po), както и високи концентрации на токсични летливи вещества. Тези съединения унищожават защитните макромолекули, ензими и протеини в слюнката, в резултат на което лигавицата става податлива, както на възпалителни, така също и на дегенеративни промени (Söder et al., 2002).

Ефектът от тютюнопушенето върху слюнчения състав на цяла нестимулирана слюнка е оценен в контролната ни група. Разпределението на изследваните лица от тази група според употребата на тютюневи изделия е представено на таблица 16.

Таблица 16. Разпределение на лицата от контролната група според тютюнопушенето

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

На базата на събраната предварително информация, средната продължителност на тютюнопушенето е 9.2 години (диапазон 1÷25), а средната дневна консумация – 10 цигари (диапазон 5÷20). Изследваните слюнчени показатели при пушачи и непушачи са дадени на таблица 17.

Таблица 17. Влияние на тютюнопушенето върху саливарните параметри при лицата от контролната група

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

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

Обсъждане на резултатите

Тютюнопушенето, действайки механично и химично върху мукозата, води до промяна в йонния, протеиновия състав, буферния капацитет и рН на слюнката. Така се променя и балансът в популациите на комесалните микроорганизми, водещ до дисбактериоза.

UA е най-важният неензимен антиоксидант в слюнката, който покрива около 85% от антиоксидантния й капацитет. Проучването на Pullishery и сътр. (2016) показва, че антиоксидантната функция на слюнката при пушачи намалява с повече от 1/3 от нормалния й капацитет. Според Tsuchiya и сътр. (2002) пушенето дори на една цигара бързо намалява концентрацията на плазмени антиоксиданти, включително и на UA. В подкрепа на тези изследвания, нашите резултати демонстрират статистически значим спад в нивата на пикочната киселина при пушачите ($p=0.004$).

Bennet and Reade (1982) докладват понижени концентрации на sIgA при пушачи в сравнение с контролната група непущачи, което се потвърждава от получените в проучването ни резултати ($p=0.031$). Подобни данни съобщават и Shilpashree and Sarapur (2012). Намалението на sIgA води до потискане на специфичната имунна защита срещу патогени микроорганизми. Редица проучвания показват, че тютюнопушенето се свързва с патологичен свръхрастеж на иначе нормалната колонизация от различни видове *Candida* в устна кухина (Singh et al., 2015). WBC защитават оралната кухина и са елемент на вродения имунен отговор. При пушачите се увеличава броя на

полиморфонуклеарните неутрофили, което предизвиква нарушение на имунната регулация с намаляване на съотношението Т-хелперни/Т-супресорни клетки, както и във В-клетъчната диференциация и съзряване, което като следствие води до намаляване нивата на sIgA. Така цигареният дим отслабва имунитета срещу инфекции, но е установено, че парадоксално насърчава автоимунни реакции (Shilpashree and Sarapur 2012; Qiu et al., 2017).

Тоталният протеин е жизненоважен компонент на слюнката и е отговорен за по-голямата част от функциите ѝ – смазочна, механична, защитна, почистваща и др. (Priadarsini et al., 2018). Като цяло основните фактори, влияещи върху концентрацията на протеин в слюнката, са скоростта на слюнчения поток, функционалното състояние на жлезистата тъкан и състава на кревикуларната течност (Shahbaz et al., 2015). Резултатите от нашето проучване показват едновременно увеличение на слюнчения албумин ($p=0.043$) и протеин ($p=0.004$) при пушачите в сравнение с непушачите. Стойностите на тези показатели в двете групи са статистически значимо различни, независимо от съществуващата вариация във филтрацията на албумина през капилярите на гингивалните цепнатини. Увеличението на белтъчните компоненти могат да се обяснят с вазоконстриктивното действие на никотина и други тютюневи компоненти, водещи до намаляване скоростта на слюнчения поток и относително нарастване концентрацията на белтъците. Тютюнопушенето води до трайно активиране на симпатиковата нервна система, а нарушеното кръвоснабдяване и хипоксия са фактори, предразполагащи към възпалителни заболявания на устната кухина (Shaila et al., 2013).

Промените в устния епител увеличават пропускливостта на лигавицата, което води до проникване на повече химични и канцерогенни субстанции в локалните тъкани (Weiner et al., 2008; Strzelak et al., 2018). Оралната мукоза търпи редица промени под влияние на тютюнопушенето с установяване на статистически значимо ($p<0.0001$) увеличение на WBC, RBC и сквамозни ЕС в 1 μL слюнка (Pullishery et al., 2016). Посочените литературни данни относно влиянието на тютюнопушенето върху клетъчния състав на слюнката съвпадат с резултатите от настоящето проучване. Повишената инфилтрация на клетъчни елементи в устната кухина се съпровожда с повишени нива на ензима LDH, който е маркер за клетъчна некроза. Регистрираните от нас по-високи стойности на LDH в слюнката при пушачите, спрямо стойностите на LDH при непушачите ($p<0.0001$), съвпадат с данни от литературата (De La Pen et al., 2007; Rai et al., 2008; Rao et al., 2017).

В литературата има разнопосочна информация за влиянието на тютюнопушенето върху sAA. Повишените ѝ нива са типичен пример за влиянието на симпатиковата нервна система (стрес или бета миметична стимулация) върху слюноотделянето (Allen, 2014). Първоначалните ефекти при всеки начинаещ пушач са повишена активност на слюнчените жлези и секрецията на sAA, като дългосрочното въздействие на никотина обратно води до намалена скорост на слюнчения поток. Hasan and Jabir (2017) твърдят, че около 25÷40% от промените в активността на sAA се дължат на вариации в скоростта на слюнчения поток. Според едни автори активността на sAA значително се повишава при пушачи (Gomina et al., 2013; Onyesom, 2012), а според други се отчитат по-ниски стойности на ензима (Weiner et al., 2008; Nagler et al., 2000). Независимо от това, че нашето проучване не установява сигнификантна разлика в активността на ензима между пушачи и непущачи, се забелязва слабо изразена тенденция към по-ниски нива при пушачите. Установено е, че дългосрочното излагане на тютюнев дим причинява намаляване на зимогенните гранули и вакуолизация на слюнчените ацинарни клетки. Възможно е ненаситените алдехиди и други компоненти в цигарения дим да действат токсично, като взаимодействат с тиоловите групи на слюнчените протеини (включително и тези на sAA), водещо до структурни и функционални изменения на тези молекули и да инхибират тяхното действие (Weiner et al., 2008; Nagler et al., 2000). Вероятно е, разнопосочните резултати за влиянието на тютюнопушенето върху слюнчената sAA да се дължат както на широката вариация на активността на ензима в норма, така и на различната давност на тютюнопушенето при отделните участници в посочените проучвания, включително и в нашето.

Тютюнопушенето се свързва с по-лоша устна хигиена, дисбактериоза и ранна загуба на зъби. То води до промени в баланса между различните нормално срещащи се представители на оралната микрофлора. По-ниските стойности на рН в пародонталния джоб при пушачите благоприятства растежа на анаеробните видове (Jiang et al., 2020), натрупване на зъбна плака и разрастване на кариогенни и патогенни микроорганизми (Hanioka et al., 2019). В подкрепа на тези данни са и резултатите от нашето проучване, при което се установява сигнификантно по-висок брой бактериални клетки в слюнката при пушачи в сравнение с непущачите ($p=0,0013$). При възпалителните заболявания на устната кухина, в резултат на компенсаторно увеличената активност на бактериалната нитратредуктаза, нарастват и нивата на нитритите в оралната течност. Повишените нива на нитрити в слюнката се свързват с по-висок риск от кариес, кандидоза и пародонтоза

(Hezel and Weitzberg, 2015). Тези литературни данни се потвърждават и от нашите резултати, сочещи сигнификантно по-високи стойности на нитритите в цяла слюнка при пушачи ($p=0.008$) в сравнение с тези от групата на непушачите.

В настоящето проучване като резултат от изследването на важни фактори, такива като пол, възраст и тютюнопушене, определящи биологичната вариация на редица биохимични показатели и клетъчни елементи в нестимулирана слюнка, могат да се направят следните изводи:

- *Не се наблюдават съществени възрастови вариации в изследваните биохимични параметри и клетъчни елементи в нестимулирана слюнка от здрави лица. Възрастта се оказва единствено съществен фактор по отношение броя на бактериалните клетки.*
- *Не се наблюдават съществени полови вариации по отношение на изследваните биохимични параметри и клетъчни елементи в нестимулирана слюнка от здрави лица.*
- *От изследваните биологични фактори тютюнопушенето, особено когато е с голяма давност, се оказва определящ фактор, водещ до статистически значими промени в състава на нестимулирана слюнка от здрави лица.*
- *Като вреден рисков фактор, тютюнопушенето увеличава стойностите на тези от изследваните биохимични показатели, които се свързват с възпалителни и некротични тъканни промени – LDH и нитрити, както и относително нарастване нивата на TP и ALB.*
- *Обратно, тютюнопушенето намалява стойностите на тези от изследваните биохимични показатели, които осигуряват специфичната и неспецифична имунна защита на оралната мукоза, такива като sIgA и UA.*
- *Тютюнопушенето се оказва определящ фактор и по отношение на клетъчните елементи в слюнка – токсичното и провъзпалително действие на химичните субстанции в цигарения дим води до сигнификантно по-високи стойности на всички изследвани клетки в нестимулирана слюнка.*

2.3. Референтни граници

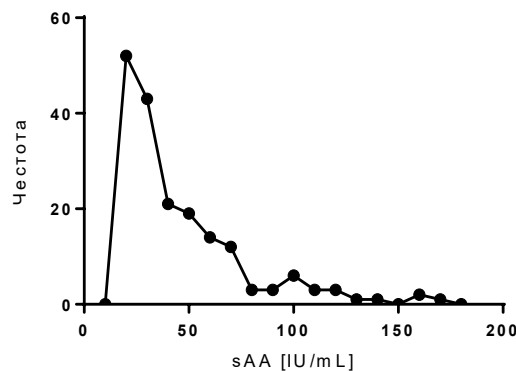
Един от недостатъците на саливарната диагностика е отсъствието на единни референтни граници за редица изследвани показатели. Познаването на биологичните вариации на саливарните параметри, изборът на метод за събиране на слюнка и

стандартизирането на процедурата са важни фактори за определяне на референтните диапазони (Mohamed, 2012).

Една от задачите на това научно проучване е да бъдат установени референтни граници, съобразени със специфични регионални и традиционни условия на бит и култура. Подборът на индивидите от контролната група (n=186) е извършен на случаен принцип – от преминаващите във ВМА-Варна лица, подлежащи на рутинен годишен профилактичен преглед или експертна оценка, без субективни и обективни отклонения (здрави индивиди) и нормален стоматологичен статус. Според получените от нас данни при изследване на някои биологични вариации не се откриха сигнификантни статистически различия по възраст и пол, поради което референтната ни група не се подраздели на подгрупи. На всяко лице са обяснени стандартизираните правила, които трябва да спазва при събирането на слюнка. Взета е и информация, свързана с тютюнопушенето. Всеки биологичен материал е съхраняван и обработван по описана процедура, според изискванията на добрата лабораторна практика и според целите на научното проучване. За всеки един показател е направен анализ на типа на разпределението на резултатите, за да се избере подходящият статистически метод за изчисление на съответните референтни граници.

В състояние на покой оралната течност се произвежда в голяма степен от субмандибуларните жлези, докато паротидните жлези са отговорни за производството само на 20% от нея, а делът на подезичните е около 8%. Тъй като sAA се синтезира основно от паротидните жлези, измерената ѝ активност зависи изключително от вида на изследваната слюнка – стимулирана или нестимулирана. В нашето изследване се използва нестимулирана (базисна) слюнка. С помощта на оптимизиран кинетичен-колориметричен метод (EPS), препоръчван от IFCC, са получени стойностите на sAA от цялата изследвана контролна група. Те варират в твърде широк диапазон – явление, което съвпада с литературните данни за големи вариации на активността на ензима при здрави лица, зависещи от психо-емоционалното състояние и начин на хранене. Получените данни са обработени статистически посредством теста на Колмогоров-Смирнов, за да се определи типа на разпределението на стойностите и да се елиминират рязко отклоняващите се. Тъй като полученото разпределение е Поасоново (фиг. 8), което наложи логаритмична трансформация и повторен анализ на данните. За изчисление на референтния интервал на показателя в слюнка са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници,

които са определени от средната стойност (mean) \pm две стандартни отклонения (SD): **17.62 \div 79.95 IU/mL**.



Фигура 8. Поасоново разпределение на стойностите на sAA в контролната група.

В литературата има доста разнообразни данни относно референтните граници на TP и ALB в слюнка. Това разнообразие се дължи и на методите, с които те се определят. Повечето автори работят с биуретов метод за измерване на TP и с бромкрезолово зелено – за албумин. Тъй като концентрациите на TP и ALB са от 100 до 1000 пъти по-ниски в сравнение с тези в серум, посочените методи са недостатъчно чувствителни за определянето им в оралната течност. За нашите цели, ние избрахме подходящи методи, пригодни да определят TP и ALB в ниския концентрационен диапазон съответно с Urinary/CSF Protein (Pirogalol red) и реактив Urine/CSF Albumin (Beckman Coulter).

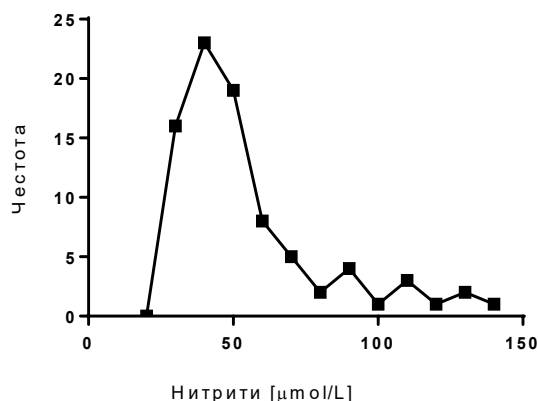
При изследване на **TP** и **ALB** в нестимулирана (базисна) слюнка от контролната група са получени стойности, обработени с теста на Колмогоров-Смирнов. Полученият тип на разпределение на резултатите и при двата показателя е нормално Гаусово разпределение и не се наложи математическа трансформация на данните. С използването на параметричен анализ за изчисление на референтните интервали на общ белтък и албумин в слюнка са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $\text{mean} \pm 2\text{SD}$. Референтните граници за TP са **410 \div 1177 mg/L**, а за албумин **29.4 \div 82.4 mg/L**.

Изследването на **sIgA** е осъществено с ELISA метод (DiaMetra, Italy), чиято аналитична надеждност бе изследвана и оценена като подходяща за целите на нашето научно проучване. Резултатите от проведеното изследване на този параметър за цялата контролна група са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов, а полученият тип на разпределение е нормално Гаусово разпределение. За изчисление на референтния интервал на показателя в слюнка са взети под внимание 95-процентния

доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $\text{mean} \pm 2\text{SD}$. Референтните граници за sIgA, определени от нас са **67.8÷148.5 mg/L**, които варират в по-тесни граници от посочените от производителя на теста (40÷170 mg/L). В брошурата към кита не са упоменати характеристиките на референтната група на базата, на която производителят е определил своите референтни граници. Повечето изследователи не определят собствени референтни граници и се основават на тези, упоменати в брошурите на китовете, с които работят и които варират в следния диапазон (35-641 mg/L).

Изследването на UA е осъществено с ензимен колориметричен тест според препоръките на IFCC. Резултатите са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов и полученият тип на разпределение е нормално Гаусово разпределение. С използването на параметричен анализ за изчисление на референтния интервал на UA в слюнка са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите \pm две стандартни отклонения от средната стойност. Референтните граници за UA са **145÷320 $\mu\text{mol/L}$** .

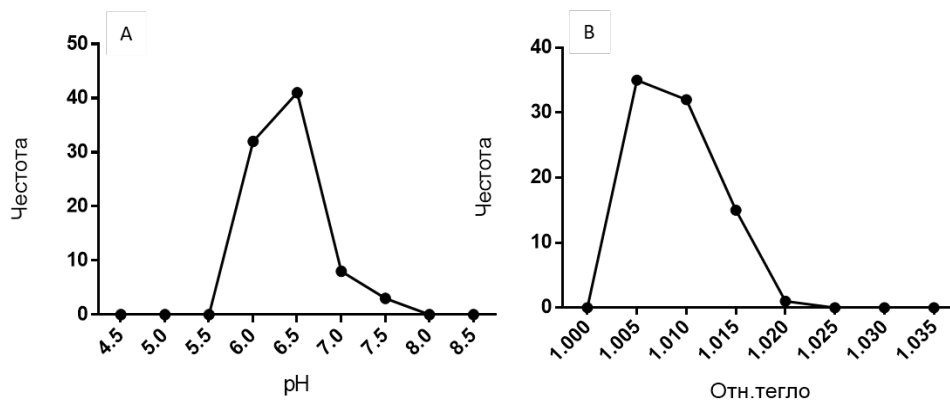
Изследването на **нитрити в слюнка** се осъществява с колориметричен тест, почиващ на метода на Грийс, чиято аналитична надеждност бе изследвана и оценена като подходяща за целите на нашето научно проучване. Получените данни са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов. Тъй като полученото разпределение е Поасоново (фиг.9), се наложи логаритмична трансформация и повторен анализ на данните. За изчисление на референтния интервал на нитрити в слюнката са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $\text{mean} \pm 2\text{SD}$, съответно **25 $\mu\text{mol/L}$** и **121 $\mu\text{mol/L}$** .



Фигура 9. Поасоново разпределение на стойностите на нитрити в контролната група

Изследването на **LDH** в слюнка се осъществява с кинетичен UV метод препоръчан от IFCC. Получените данни са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов, а полученият тип на разпределение е бимодално, което наложи логаритмична трансформация и повторен анализ на данните. За изчисление на референтния интервал на LDH в слюнка са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $mean \pm 2SD$, съответно **96 U/L** и **360 U/L**.

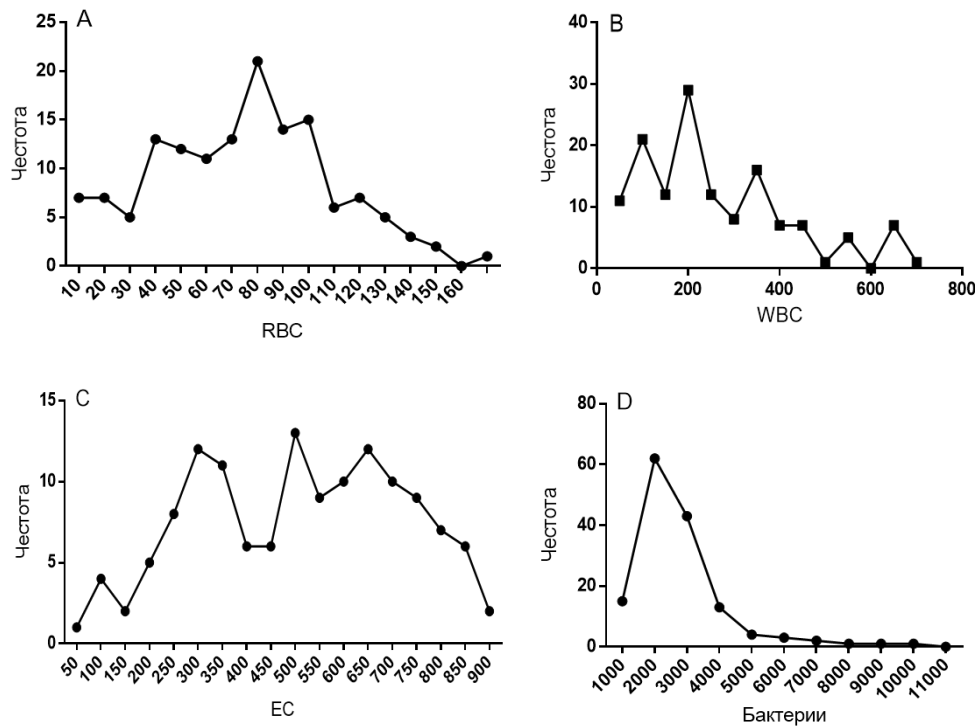
В областта на стоматологията отдавна са определени референтните граници на рН и относителното тегло и са проучени промените в киселинността на оралната течност при кариес. В многобройни литературни източници се докладва, че това са единствените слюнчени показатели, които варират в тесни граници (Kubala et al., 2018; Островски 2012). В нашето проучване тези изследвания са извършвани с помощта на полуколичествен метод с уринни тест-ленти. Разпределението на резултатите ни е дадено на фиг. 10А и 10В, което отново доказва тесния диапазон, в който варират тези показатели – за относително тегло: **1.005÷1.015** и за рН: **6.0÷7.5**.



Фигура 10. Разпределение на резултатите за рН (А) и относително тегло (В) на слюнка от здрави индивиди

Стойностите на RBC, WBC, ЕС и бактериите са определени посредством проточен флоуцитометричен метод на автоматичен анализатор Fus100 по описана в точка 1.1. процедура. На фигура 11 е даден графичният изглед на разпределение на резултатите според честотата им за четирите вида клетъчни елементи в слюнка. Получените данни са обработени статистически с теста на Колмогоров-Смирнов, с помощта на който се доказва, че разпределението на резултатите за тези показатели не е Гаусово. Това наложи логаритмична трансформация и повторен анализ на данните. За изчисление на референтния интервал на клетъчните елементи в слюнка са взети под внимание 95-

процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $\text{mean} \pm 2\text{SD}$, както следва: RBC $14 \div 156/\mu\text{L}$; WBC $58 \div 451/\mu\text{L}$; EC $104 \div 698/\mu\text{L}$; бактерии $1810 \div 5115/\mu\text{L}$.



Фигура 11. Разпределение на резултатите за RBC (A), WBC (B), EC (C) и бактерии (D) в слюнка от здрави индивиди

Обсъждане на резултатите

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

Съпоставянето на определените от нас референтни граници на изследваните биохимични показатели в слюнка с данни от такива литературни източници, чийто подход на изследване на слюнката е сравнително близък до нашия са представени в таблица 18.

Таблица 18. Референтни граници на изследваните от нас биохимични параметри в слюнка, сравнени с данни от литературата

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

Литературни източници: ¹Nunes et al., (2015); ²Soukup et al., (2012), ³брошура DiaMetra; ⁴Брещенко и Быков (2018); ⁵Nagler et al., (2001); ⁶Bel'skaya et al., (2020); ⁷Shaila et al., (2013); ⁸Tatarczak-Michalewska et al., (2019); ⁹Yang et al., (2015).

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

От сравнителния анализ се установява, че определените от нас референтни граници на изследваните биохимични маркери в нестимулирана слюнка са сходни с тези, обявени в избраните от нас литературните източници. Наблюдаваните незначителни различия вероятно се дължат на особености на референтните индивиди в различните проучвания (брой, възрастови характеристики, използвани различни критерии за включване и изключване в изследванията), използвани методи на изследване на съответния параметър и тип на изследваната слюнка. Прави впечатление, че само в един литературен източник са обявени значимо различни стойности за РГ на ензима LDH (Bel'skaya et al., 2020). Въпреки че авторите са използвали нестимулирана слюнка, определят многократно по-високи стойности за LDH в сравнение с нашите или такива от други литературни източници (Nagler et al., 2001). Това се дължи на приложения от тях метод (виж обяснение на стр. 105). В цитираните от нас проучвания не се упоменава начинът на събиране на слюнката (свободно изтичане в контейнер или чрез напояване на тампон, поставен в устната кухина). Произходът на LDH в цяла слюнка е предимно за сметка на излющените епителни клетки. Когато нестимулираната слюнка се събира посредством тампон е вероятно в нея да попаднат по-голямо количество разрушени епителни клетки,

обуславящи и по-високи стойности на LDH, в сравнение със слюнка, събрана чрез свободно изтичане, както е в нашето проучване. Интересен е и фактът, че метални йони в слюнката биха могли да потиснат активността на LDH (Nagler et al., 2001). В България все още са популярни пломбите с амалгама, както и наличието на метални коронки и би могло да се изкаже хипотезата, че и това може да бъде причина за наблюдаваните леко по-ниски стойности на LDH.

Научната литература изобилства от проучвания върху химичния състав на слюнката, но все още са недостатъчни данните за клетъчния ѝ състав, като най-оскъдни са данните относно референтните стойности на клетъчните елементи в оралната течност. Съпоставянето на определените от нас референтни граници на изследваните клетъчни елементи в слюнка с данни от литературата са представени в таблица 19.

Таблица 19. Референтни граници на клетъчните елементи в слюнка, сравнени с данни от литературата

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

Литературни източници: ¹Aps et al., (2002); ²Coopman et al., (2018); ³Calouius, (1958); ⁴Vidovic et al., (2011); ⁵Klein (1962); ⁶Dorion (2016); *стимулирана слюнка, FCM

Съпоставянето на резултатите ни с данни от литературата е затруднено, тъй като в относително ограничения брой литературни източници се откриват множество различия относно типа на слюнка, начинът ѝ на събиране, методът на броене, както и броят и характеристиките на изследваните индивиди. Всичко това обуславя твърде различните резултати, посочени в таблица 19. В литературните източници преди 2000-та година, както и в „Bitemark Evidence – A Color Atlas and Text“ (2016) под редакцията на Dorion се открива, че броенето и диференцирането на клетъчните елементи в слюнка е

извършено микроскопски, понякога и с подходящо оцветяване. В част от случаите е работено със стимулирана слюнка, а в част с нестимулирана слюнка. Изследваните индивиди не са специално подбрани референтни индивиди, а служат като контролна здрава група за сравнение с индивиди с определени заболявания на устната кухина (гингивити, парадонтоза, кариеси и др.). Обикновено в тези проучвания са включени малък брой изследвани лица. По тази причина в тези източници се откриват данни основно за левкоцити и епителни клетки и липсват данни за еритроцити и бактерии. В последните десетилетия се предпочита автоматичното изброяване на клетъчни елементи в слюнка пред мануалното им камерно броене. Но за целта се използват разнообразни анализатори, използващи различни принципи на броене. Така например някои изследователи определят броя им с уринен анализатор Sysmex UF100/UF1000i (Aps et al., 2002; Coopman et al., 2018). Vidović и сътр. (2011) определят броя на левкоцитите и диференцирането им на отделни субпопулации с помощта на флоуцитометър LSR II (FACS-Diva software, View, USA). При тези по нови изследвания се използва предимно стимулирана слюнка, като обикновено липсват данни за спазването на стандартизираното събиране на слюнка. Само при изследването на Vidović и сътр. (2011) е упоменат начина ѝ на събиране. Доколкото ни е известно липсват данни в литературата за броене на клетъчни елементи в слюнка с използвания от нас уринен анализатор FUS100, а единствено с уринни анализатори Sysmex UF100/UF1000i, чийто принцип на броене е кондуктометричен, а диференцирането им посредством флуоресцентна флоуцитометрия. Нашият метод е базиран на флоуцитометрично микроскопско високоскоростно заснемане на изображения за изброяване и идентификация на формените елементи в пробата и за да се намали недостоверността от автоматичното броене, се налага допълнително визуално верифициране на клетъчните елементи, като се взема под внимание тяхната морфология и големина. Всички изтъкнати до тук причини определят в по-голяма или по-малка степен различията между данните в настоящото проучване и тези посочени в литературата. Считаме, че поради стриктното спазване на всички правила от преданалитичния етап относно стандартизираното събиране на слюнка и изискванията за определяне на референтни граници сме определили достоверно броя на клетъчните елементи в нестимулирана слюнка за нашата популация с използвания от нас апарат и метод.

Изводи:

- *Определени са референтни граници за множество биохимични показатели в нестимулирана слюнка на индивиди от българската популация, като са спазени стриктно както всички правила относно стандартизираното събиране на слюнка, така и изискванията за коректно изработване на референтни граници.*
- *Определени са референтни граници за клетъчните елементи в нестимулирана слюнка от индивиди от българската популация, като са спазени стриктно всички правила както от преданалитичния етап относно стандартизираното събиране на слюнка, така и изискванията за коректно изработване на референтни граници.*
- *От направеното сравнение с литературните данни се установява, че определените от нас референтни диапазони на изследваните биохимични показатели в нестимулирана слюнка са близки до референтните граници от литературни източници, в които е съобщено както за стандартизирано вземане на слюнка, така и за методи, съобразени с особеностите на слюнката като биологичен материал.*
- *Незначителните различия в биохимичните параметри вероятно се дължат на особености на нашата референтна група, отразяващи специфични регионални и традиционни условия на бит и култура.*
- *Поради оскъдни данни в литературата относно референтни граници за клетъчни елементи в нестимулирана слюнка подобно сравнение между нашите данни и тези в литературата не може да бъде коректно направено.*

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

Слюнката е първата биологична течност, която влиза в контакт с екзогенно внесени вещества като храна, напитки, цигарен дим, микроорганизми и др. Тя се явява първа линия на защита срещу медиран от свободните радикали оксидативен стрес (ОС), тъй като дъвкателният процес и усвояването на приетите храни стимулира различни реакции, включително пероксидация (Battino et al., 2002). Като част от неспецифичната имунна защита, по време на фагоцитозата, PMN клетки продуцират редица антимикробни фактори, включително и ROS (Greabu et al., 2011). Слюнката притежава естествена

антиоксидантна защита, включваща както ендогенни, така и екзогенни антиоксиданти, които имат решаващо значение за нормалния редокс баланс в клетките. За тяхното изследване сме избрали по-подходящия лабораторен тест – SAT тест, изяснено вече в точка 1.2.2.

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

При изследване на показателите за налични реактивни кислородни форми (dROMs тест) и антиоксидантния капацитет (SAT тест) в нестимулирана слюнка от индивидите, формиращи контролната ни група са установени следните стойности (таблици 20, 21):

Таблица 20. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в зависимост от пола

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

Сравнителният анализ е осъществен с t-test

Таблица 21. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в зависимост от възрастта

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

Приложен е One way ANOVA

dROMs – реактивни кислородни метаболити; SAT слюнчен антиоксидантен тест

Обсъждане на резултатите

При изследване влиянието на фактора пол върху параметрите за ОС в слюнка в нашето проучване не се наблюдават статистически значими различия. За разлика от нас, Lettrichová и сътр. (2015) и Sculley and Langley-Evans (2003) докладват за значимо по-ниски стойности на антиоксидантния капацитет (АОС) в слюнката, изследвана с други два теста – тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) и желязо редуцираща способност на плазмата (FRAP) при млади жени в сравнение с тези, установени при мъже на съответната възраст. Тези различия биха могли да се дължат на разлика във възрастта (23.4 ± 3.0 години) и броя ($n=34$) на изследваните лица, както и разликата в химизма на тези два метода. В изследването на Benedetti и сътр. (2014) АОС, изследван посредством SAT теста, е също значимо по-висок при мъжете спрямо жените, но и при това проучване

участват млади индивиди във възрастов диапазон 18-40 години за разлика от нашата група, която е в диапазона 20-64 години. В нашето проучване факторът възраст доминира над фактора пол върху изследваните параметри, тъй като е установено значимо нарастване на стойностите на d-ROMs при лицата от трета ($p=0.0362$) и четвърта ($p=0.0004$) възрастови групи (41÷64 г.) спрямо тези от първа група (20÷30 г.), установено посредством тест One way ANOVA с корекция на Bonferroni. Логично е да се наблюдава и намаление на АОС с възрастта, което е установено при нашето проучване: стойностите, получени посредством SAT теста са по-високи в първа възрастова група, сравнени с тези от последната възрастова група ($p=0.0017$). В експериментален модел с мишки Yamauchi и сътр. (2017) установяват нарушен баланс между оксиданти и антиоксиданти, обуславящ настъпването на ОС в слюнката, с нарастване на възрастта и намаляване на слюнчения поток. Интересно е да се спомене, че резултатите от това проучване са получени посредством d-ROMs и VAP тестове.

3.2. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в слюнка

Хранителните навици, факторите на околната среда и начинът на живот също могат да оказват влияние върху слюнчения АОС. Употребата на алкохол и тютюнопушенето са важни вредни навици, водещи до покачване на реактивни кислородни форми и намаляване на АОС, както в слюнката, така и в серума (Peter et al., 2013). Нитритите в слюнка, освен информация за налично бактериално възпаление, дават и индиректни данни за синтеза на NO и натрупване на реактивни азотни форми (RNS). Данните от нашето проучване установяват сигнификантно по-високи стойностите на нитритите в цяла слюнка при пушачи ($p=0.0019$, табл.17) в сравнение с групата на непушачите. Редица изследователи считат, че натрупването на реактивни кислородни форми се осъществява чрез неутрофилен респираторен взрив, предизвикан от цигарения дим (Chapple and Matthews, 2007). Според Strzelak и сътр. (2018) въздействието на цигарения дим върху имунната система е двойко и многообразно: от една страна – прововъзпалително, а от друга – чрез потискане на неутрофилното активиране и хемотаксис, води до нарушен имунен отговор, наблюдаван при пушачите. Резултатите от настоящето проучване относно нарушения баланс между оксиданти и антиоксиданти в слюнка при пушачи в сравнение с непушачи са представени на таблица 22.

Таблица 22. Влияние на тютюнопушенето върху слюнчените показатели на оксидативен стрес при лицата от контролната група

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

Сравнителният анализ е осъществен с *t*-test

Обсъждане на резултатите

Установява се статистически значимо нарастване на оксидантите и съответно значимо намаление на антиоксидантите. Доказаният нарушен баланс между тях обуславя наличието на оксидативен стрес, развиващ се в устната кухина при пушачи. Benedetti и сътр. (2014), за разлика от повечето проучвания, включително и нашето, не откриват значителна разлика в нивата на SAT при двете групи – пушачи и непушачи, като вероятното обяснение за този резултат е голямата диспропорция в броя на изследваните лица – 10 пушачи спрямо 55 непушачи.

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

При изследване на показателите за оценка на оксидативен стрес посредством d-ROMs тест и BAP тест в серум от индивидите, формиращи контролната ни група са установени следните стойности (таблици 23 и 24).

Таблица 23. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в зависимост от пола

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

Сравнителният анализ е осъществен с *t*-test

Таблица 24. Генериране на реактивни кислородни форми и общ антиоксидантен капацитет в зависимост от възрастта

Показател (мерна единица)	20÷30 години (mean±SD)	31÷40 години (mean±SD)	41÷50 години (mean±SD)	51÷64 години (mean±SD)	<i>p</i> value
dROMs [UCARR]	348.2±58.28	358.1±54.80	383.7±54.38	415.7±90.59	0.0207
BAP [µmol]	2777±264.6	2645±291.4	2764±536.2	2675±304.5	ns

Приложен е *One way ANOVA* dROMs – реактивни кислородни метаболити; BAP биологичен антиоксидантен потенциал

Обсъждане на резултатите

Слабо и незначимо изразени са вариациите по отношение на пола в нашето проучване. За разлика от нас други изследователи установяват значими различия (Ide et al., 2002; Kander et al., 2017). Така напр. в обзора на Kander (2017) се отчитат по-ниски нива на АОС и по-високи нива на реактивни кислородни форми при мъжете спрямо тези, установени при жени. Лансира се идеята, че при физиологични условия жените са по-малко податливи на оксидативен стрес. Това би могло да се дължи на приписваните антиоксидантни свойства на естрогена и/или на предизвиканата от него промяна в експресията/активността на антиоксидантните ензими, както и на повишена активност на NADPH-оксидазата при мъжете. Обратно, Brunelli и сътр. (2014), изследвайки здрави индивиди във възрастовия диапазон от 25 до 70 години (n=195) с d-ROMs тест и VAP тест, съобщават за значимо по-висока степен на ОС в серум при жените в сравнение с мъжете, но не откриват разлики в АОС при двата пола. За разлика от Brunelli и сътр., които не намират значителни разлики между жените в периода преди менопаузата и след менопаузата, Bhatia и сътр. (2012) твърдят, че оксидативният стрес при жените се задълбочава с навлизане в менопаузата и е съпоставим с този при мъжете. Vassalle и сътр. (2008), изследвайки индивиди на възраст 60-75 години с d-ROMs тест за оценка на ОС също не намират значима разлика между мъже и жени, като дори наблюдават тенденция за по-високи стойности при жените. Отчитайки разнопосочните резултати в литературата за половите различия по отношение на ОС, бихме могли да заключим, че полът не е определящ фактор, а по-скоро влияят фактори на околната среда и най-вече възрастта. Това се потвърждава и от нашите изследвания. Анализът на данните от нашето проучване показва постепенно нарастване на ROS с възрастта, като различията между първата възрастова група и последната декада достигат статистическа значимост (тест One way ANOVA с корекция на Bonferroni $p=0.0185$). Теорията за оксидативния стрес и стареенето се основава на хипотезата, че именно с напредване на годините, генерираните в по-големи количества реактивни кислородни форми водят до натрупване на редица патологични отклонения. Различни проучвания описват покачване нивата на ROS и съответно намаляване на АОС при възрастните хора, обявявайки ги като патогенетични фактори, играещи решаваща роля за сърдечно-съдови, хронични бъбречни заболявания, хронична обструктивна белодробна болест, невродегенеративни и онкологични заболявания (Andriollo-Sanchez et al., 2005; Liguori et al., 2018; Tan et al., 2018). Нашите данни съответстват на многобройните публикации в литературата за възрастово

обусловения ОС, като вероятните причини, с които се прави опит да се обясни този факт е превалирането на хората с наднормено тегло и нарушен метаболизъм с напредване на възрастта, както и продължителното въздействие на вредни навици и различни неблагоприятни фактори на околната среда.

3.4. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на ОС в серум

Цигареният дим притежава прооксидантни свойства, дължащи се на разнообразни токсини и оксиданти в него. Освен локалното действие на цигарения дим върху тъканите на храносмилателната и дихателната системи, общоприето е становището, че свободните радикали в цигарения дим действат върху целия организъм като потенцират пероксидацията на макромолекули като липидите в клетъчната мембрана, белтъци, нуклеинови киселини и стимулират провъзпалителни реакции (Valavanidis et al., 2009). Резултатите от настоящето проучване относно нарушения баланс между оксиданти и антиоксиданти в серума при пушачи в сравнение с непушачи са представени на таблица 25.

Таблица 25. Влияние на тютюнопушенето върху показателите на оксидативен стрес при лицата от контролната група

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

Сравнителният анализ е осъществен с t-test

Обсъждане на резултатите

Ясно се вижда, че при пушачите в сравнение с непушачите се установява значимо нарушение в баланса между оксиданти/антиоксиданти, в полза на оксидантите, водещо до развитие на ОС. Наблюдаваните по-високи стойности на антиоксидантния потенциал при пушачи, макар и незначимо различни, вероятно отразяват адаптивни механизми на организма за справяне с нарушения баланс. Други проучвания също установяват, липса на значима разлика в антиоксидантния капацитет при пушачи и непушачи, но доказват, че тютюнопушенето има статистически значим ефект върху количеството на генерираните ROS (Lykkesfeldt et al., 2004; Block et al., 2002).

За оценка на баланса оксиданти/антиоксиданти и развитието на оксидативен стрес са въведени редица индекси, като част от тях включват и показателите, получени посредством dROMs и ВАР тестове. През 2015-та година Yamamoto и сътр. въвеждат

модифицирано съотношение ВАР/dROM (mOA), изчислено със следната формула: $mOA = \frac{BAP}{dROMs * 7.541}$. Определената от тях cut-off стойност е 1.0, като стойностите <1.0 са индикативни за намален антиоксидантен потенциал. Използвайки този индекс, ние намираме, че при пушачи mOA е 0.87, а при непушачи mOA – 1.01, което е още едно потвърждение за негативната роля на тютюнопушенето за възникване и поддържане състояние на ОС при пушачите.

Резултатите от настоящето проучване относно влиянието на важни фактори като пол, възраст и тютюнопушене върху биологичната вариация на показателите за ОС в слюнка и серум водят до следните изводи:

- *Полът не оказва влияние върху посочените показатели.*
- *Факторът възраст се очертава като най-съществен по отношение на баланса оксиданти/антиоксиданти, като с нарастването на възрастта ОС се задълбочава.*
- *Тютюнопушенето е друг определящ фактор, обуславящ дисбаланса между оксиданти и антиоксиданти, водещ до появата на ОС.*

3.5. Определяне на референтни граници на показателите на ОС в слюнка и серум

С помощта на d-ROMs тест е определена концентрацията на ROS в слюнка и серум при контролната група, а антиоксидантният капацитет е определен с помощта на SAT тест в слюнка и ВАР тест в кръвен серум. Получените резултати са обработени статистически посредством теста на Колмогоров-Смирнов и е установено нормално Гаусово разпределение. За изчисление на референтния интервал на показателите в слюнка и серум са взети под внимание 95-процентния доверителен интервал и стойностите, формиращи долната и горна референтни граници, които са определени от $mean \pm 2SD$.

3.5.1. Показатели на ОС в слюнка

В таблици 26 и 27 са отразени определените от нас референтни граници, както и тези, декларирани в брошурите на посочените тестове. D-ROMs тестът е разработен и валидиран от производителя единствено за серум, поради което не се посочват референтни граници за слюнка.

Таблица 26. Референтни граници на показателите за оксидативен стрес в слюнка

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

**95% доверителен интервал*

Обсъждане на резултатите

Benedetti и сътр. (2014), валидирайки метода за антиоксидантен капацитет в слюнка (SAT), анализират 60 проби от здрави индивиди на възраст от 18 до 40 години. Те също установяват, че стойностите на показателя са нормално разпределени и варират в диапазона на 947÷1459 $\mu\text{mol/L}$. Въпреки, че нашите референтни индивиди формират по-широк възрастов диапазон (20÷64 години), е очевидно, че определените от нас стойности на референтния интервал са твърде близки до тези, посочени както в проучването на Benedetti, така и спрямо дадените от производителя граници.

В достъпната до нас литература липсват данни за определяне на ROS в слюнка с помощта на d-ROMs тест, освен тези, проучени в миши експериментални модели. Не открихме и данни за референтни граници на генерираните реактивни кислородни форми в слюнка и липсва възможност да направим сравнение на нашите данни с такива от други проучвания.

3.5.2. Показатели на ОС в серум

Таблица 27. Референтни граници на показателите за оксидативен стрес в серум

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

**95% доверителен интервал*

Обсъждане на резултатите

В таблица 28 са представени препоръчаните от Diacron, Italy стойности на двата изследвани показателя в серум, за да се оцени наличието и степента на ОС. Измереният от нас АОС в референтната ни група отговаря на оптималните стойности, посочени от производителя. Що се отнася до стойностите на ROS в серум на референтните ни индивиди, е интересно да се отбележи, че средните им нива ($360,5 \pm 51.5$ UCARR) не попадат в нормалните граници, определени от производителя, а достигат патологични

стойности, сочещи умерена степен на генериране на ОС. Определените от нас референтни граници отразяват национални и регионални особености на популацията, като вероятните причини за повишените нива биха могли да са следствие на различния начин на живот, на различни фактори на средата, както и на често срещаните вредни навици като тютюнопушене, употреба на алкохол и неправилно хранене, водещо до наднормено тегло. Друг интересен факт, който е необходимо да се подчертае е, че се срещат и други проучвания, чиито контролни групи са със стойности на ROS близки до нашите, също надскачащи определените от производителя на теста референтни граници. В проучването на Trotti и сътр. (2002), в което е изследвана част от италианска популация, генерираните и измерени с d-ROMs тест ROS при здрави индивиди е 344.5 ± 68.3 UCARR. Нещо повече, изследвайки показателя за ОС и промените му, свързани с начина на живот на здрави лица с японски произход, Fukui и сътр. (2011) също откриват по-високи стойности на ROS, определени посредством d-ROMs тест съответно 365 ± 74 UCARR за жени и 321 ± 61 UCARR за мъже. В брошурата на теста липсват данни относно референтната група (брой изследвани лица, възраст, пол, критерии на включване и изключване), както и принципите за определяне на различните степени на тежест на ОС. Това затруднява сравнението на данни от различните проучвания с тези, предложени от производителя.

Таблица 28. Оценка на оксидативния стрес (ОС) в серум, измерен с dROMs и BAP местове (no Diacron International, Grosseto, Italy)

	Оценка за степен на ОС	BAP [$\mu\text{mol/L}$]	Оценка за АОС
250÷300	Референтни граници	>2200	Оптимални стойности
	Гранични стойности	2200÷2000	Гранични стойности
	Ниско ниво на ОС	2000÷1800	Лек дефицит
	Умерено ниво на ОС	1800÷1600	Умерен дефицит
	Високо ниво на ОС	1600÷1400	Висок дефицит
	Много високо ниво на ОС		Много висок дефицит

При определяне на референтните граници на показателите за оксидативен стрес в слюнка и серум могат да се направят следните изводи:

- По отношение на антиоксидантния капацитет на слюнка и на серум нашата популация не се отличава съществено от другите популации, цитирани в литературата.

отразяващ нивата на оксидативния стрес, не могат да бъдат сравнени както с данни от производителя на теста, така и с такива от литературата.

- *Определените от нас референтни граници на d-ROMs в серум на изследваната популация обхващат по-широк диапазон от стойности в сравнение с тези, посочени от производителя. Този диапазон покрива три интервала – референтния интервал и следващите два интервала, посочени като патологични и отразяващи различни степени на оксидативен стрес.*
- *Определянето на регионални и/или национални референтни граници е задължително условие, предоставящо по-адекватни възможности за оценка на ОС, възникващ при различни патологични (психически и физически) отклонения на конкретна изследвана популация.*

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

Най-изследваният биологичен материал в диагностичния процес е венозната кръв и получените от нея серум или плазма. Въпреки това често се налага да се използват и други биологични проби като урина, цереброспинална течност, пунктати и др., като стойностите на изследваните в тях показатели се сравняват с тези в серум. За да могат коректно да се интерпретират резултатите от изследваните анализи в слюнка, като алтернативна матрица на серум/плазма, трябва да се определят нормалните съотношения на концентрациите им в двата биологични материала. Множество причини биха могли да обяснят различията в концентрациите на отделните параметри, измерени в слюнка и серум/плазма. Така например голяма част от изследваните саливарни анализи, такива като sIgA и лизозим се произвеждат основно от слюнчените жлези, преобладават в слюнка и трудно могат да бъдат открити в плазмата. Обратно, вещества със сравнително висока молекулна маса и основно с кръвен произход, като албумин и IgG, трудно могат да попаднат в слюнката чрез процесите на ултрафилтрация и стойностите им са многократно по-високи в плазмата в сравнение с оралната течност. Според нормалните съотношения на концентрациите в слюнка/серум слюнчените анализи могат да бъдат класифицирани в **три категории** (Kang et al., 2018):

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

На таблица 29 сме категоризирали изследваните от нас слюнчени параметри чрез сравнение на определените от нас РГ в слюнка, съпоставени с общоприетите им референтни граници в серум.

Таблица 29. Сравнение между саливарните и серумни нива на изследваните анализи

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

*посочени са стойности за общия IgA в серум, а sIgA в серум представлява до 10% от общия IgA;
¹според Tsikas D. (2012)

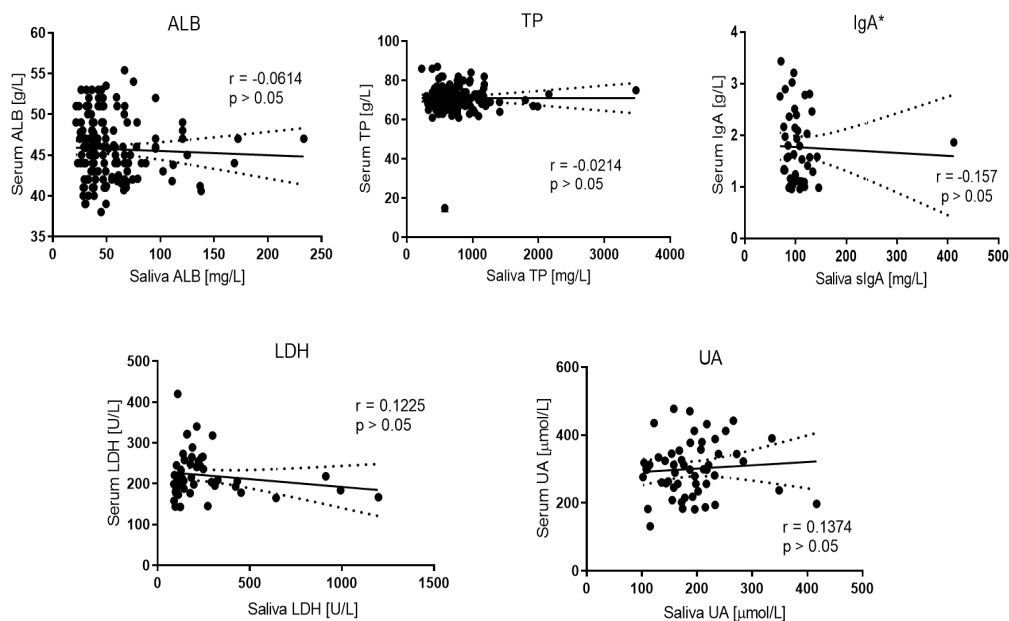
По литературни данни, според отношението слюнка/серум, слюнченият sIgA спада към втора група, т.е. стойностите му са близки до тези в серума. Резултатите от настоящето проучване също подкрепят тези данни, въпреки че стойностите на sIgA в слюнка и IgA в серум, посочени в таблица 29, видимо се различават многократно. В структурно отношение sIgA е димер, известен още като IgA2 и съставлява до 40% от общото количество IgA в слюнката (Reinholdt and Husby, 2013). Тази фракция от общия IgA се определя специфично с помощта на ELISA метод. От друга страна, рутинно в серум се измерва общото количество IgA, а не отделните му фракции (мономерен IgA,

известен като IgA1 и димерен IgA2). В серум sIgA представлява само около 8 – 10% от общия IgA. В нашето проучване сме определили и серумните нива на общия IgA в контролната група, като получената средна стойност е 1856 ± 760 mg/L. Като се вземе предвид, че sIgA в серум е само 10%, може да се предположи, че нивата на серумния sIgA в контролната група е 185.6 ± 76 mg/L и съотношението слюнка/серум попада в границите между 0.5 и 1.5, т.е. със сигурност можем да заключим, че слюнченият sIgA спада към втора категория показатели.

В нашето проучване съществува несъответствие с данните от литературата, според които активността на LDH в слюнка е над 1.5 пъти по-висока в сравнение с активността ѝ в серум. Получените от нас стойности на слюнчената LDH са близки до тези на серумните активности. За разлика от нас, Rehak и сътр. (2005) и Bel'skaya и сътр. (2020) категоризират LDH към трета група. Bel'skaya намира 3 пъти по-високи стойности на ензима, въпреки че го определя в цяла нестимулирана слюнка. Най-вероятната причина за тези различия е методът, който използва Bel'skaya за определяне активността на ензима – след като посочените от нея стойности в слюнката варират от 905.6 до 1911.0 U/L и те са три пъти по-високи от тези в серума, следва косвено да се заключи, че използвания от нея UV-метод е с посока на реакцията пируват→лактат и с референтни граници за серум 240-480 U/L. Използваният от нас оптимизиран UV-метод по IFCC е с посока лактат→пируват с почти два пъти по-ниски референтни граници (134-225U/l).

Слюнката има сложен механизъм на образуване и съдържа разнообразни аналити с различен произход. Като биологичен материал, който би могъл да предостави допълнителни данни, полезни за диагностичния процес, възниква необходимост да се проучат и корелационните зависимости между концентрациите на изследваните параметри в слюнка и тези в серум.

Bel'skaya и сътр. (2020), правейки сравнителен анализ на 24 параметъра в слюнка и плазма, установяват слаба корелативна зависимост само при 7 от тях (pH, UA, Urea, Ca^{++} , Mg^{++} , ALAT, LDH). Nunes и сътр. (2011), проучвайки слюнчените параметри чрез метаанализ, също намират слаба корелативна зависимост между серум и слюнка за UA. В нашето проучване е изследвана взаимовръзката между саливарни и серумни нива при пет показателя (ALB, TP, sIgA, LDH и UA), посочени във фигура 12.



Фигура 12. Корелационни зависимости между слюнчени и серумни нива на изследваните биохимични показатели

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

Отсъствието на корелативни зависимости се потвърждава и от изследванията на редица автори, които също не откриват корелация между слюнчените и серумни нива за повечето показатели, изследвани при здрави индивиди (Nunes et al., 2011; Bel'skaya et al., 2020). По литературни данни съществува консенсус за налична добра корелационна зависимост в двата изследвани биологични материала единствено за пикочната киселина и урея, но при пациенти с подагра и хронична бъбречна недостатъчност (Bilancio et al., 2019). Базирайки се на тези резултати, авторите дори предлагат използването на слюнчените UA и урея за мониториране хода на болестта и приложеното лечение на пациентите с тези две заболявания или проследяване ефективността на хроничната диализа (Blicharz et al., 2008).

Изводи:

- *При здрави индивиди не се доказва значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум. Вероятно това се дължи на факта, че слюнката не е просто пасивен "ултрафилтрат" на серума и съставът ѝ се определя от разнообразни фактори, водещи до различни съотношения на нейните компоненти в сравнение с тези в серума.*

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

Хроничните заболявания на горния храносмилателен тракт са едни от често срещаните болести, за които се установява нарастваща честота с напредване на възрастта. Етиопатогенетично хроничните гастрити биват няколко вида: тип А (честота около 2-5%) – автоимунна генеза с атрофия на стомашната лигавица; тип В (честота 80-85%) – засягащ антрума на стомаха и дължащ се на НР инфекция; тип С (честота 5-10%) – причинява се от различни химични агенти (НСПВС, КС и др. медикаменти, алкохол, агресивно действие на жлъчката при рефлукс към стомаха и др.). Редица коморбидни състояния и медикаменти провокират диспептични оплаквания и водят до обостряне на гастрита. Хроничният ход на заболяванията изисква мониторирането им през по-кратки или дълги интервали и за пациентите би било много по-удобно и щадящо това проследяване да се извършва с помощта на минимално инвазивни и необременяващи процедури. Изследването на различни биохимични показатели и маркери в оралната течност (ОТ) би позволило да се избегнат неприятни и рискови за пациента манипулации, каквито са вземане на кръв, гастроскопия, биопсия и др., особено при проследяване хода на вече диагностицирани заболявания и установяване на релапс или ремисия.

За да се изпълнят задачите по настоящия раздел са подбрани 60 лица с доказан хроничен гастрит на средна възраст 58.7 ± 12.1 години, които отговарят на критериите за включване в изследването (т.1 Изследвани лица) и не покриват тези за изключване от проучването. От здравите доброволци, участвали в проучването, са подбрани 80 индивида на средна възраст 56.94 ± 8.7 години, съответстваща на тази на пациентската група ($p > 0,05$).

5.1. Характеристика на пациентите с хронични гастрити

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

Групата на пациентите е разделена на две подгрупи – първа подгрупа, включваща пациентите с хроничен гастрит и наличие на антитела и антигени, свързани с НР

инфекция (НР(+)) гастрити и втора подгрупа, включваща пациентите с хроничен гастрит, несвързан с НР инфекция (НР(-)) гастрити).

Таблица 30. Демографски характеристики на пациентите с хроничен гастрит

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

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

Диагнозата на хроничния гастрит се основава главно на инвазивен ендоскопски метод. При постъпване в болничното заведение пациентите са подложени на ендоскопско изследване, чиито резултати са обобщени в Таблица 31.

Таблица 31. Ендоскопски характеристики на възпалителните промени и топографско разпространение в гастродуоденалната лигавица

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

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

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

НР бактерии участват в патогенезата не само на гастродуоденити, но и на различни заболявания на устната кухина, като рецидивиращ афтозен стоматит, пародонтоза, както и плоскоклетъчен карцином, синдром на пареща уста и халитоза. Наличието на НР бактерии в зъбната плака и слюнката се явява като резервоар на микроорганизма, инфектиращ или реинфектиращ ГИТ (Medina et al., 2017).

За целите на проучването са подбрани и изследвани няколко показателя в слюнка и серум, свързани с възпалението, оксидативния стрес и имунологичните механизми на защита (таблици 32 и 33).

Таблица 32. Изследвани слюнчени параметри при пациенти с хроничен гастрит в сравнение с контролната група

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

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

Таблица 33. Изследвани серумни параметри при пациенти с хроничен гастрит в сравнение с контролната група

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

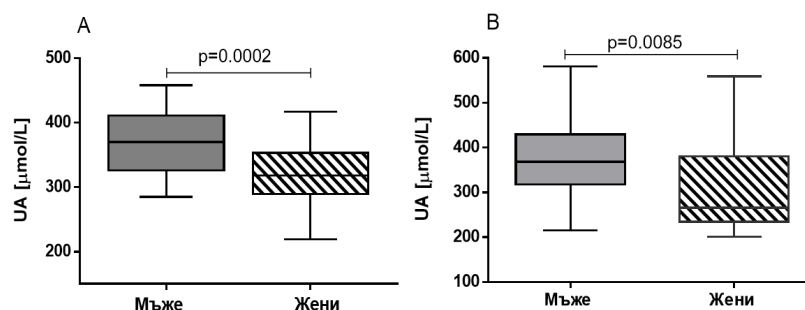
Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni. (p* – сравнение между HP(+) и HP(-) пациенти; p** – сравнение между HP(+) пациенти и контролната група; p*** – сравнение между HP(-) пациенти и контролната група)

Обсъждане на резултатите

Инфекцията с НР причинява хроничен гастрит и предизвиква постоянен възпалителен отговор. UA е не само краен продукт от обмяната на пуриновите нуклеотиди, но представлява и ендегенен локален и системен антиоксидант (Sautin and Johnson, 2008). В литературните източници, отнасящи се до НР(+) хронични гастрити, не сме открили информация за взаимовръзка между саливарни нива на UA и етиопатогенетични и клинични характеристики на хроничните гастрити. Такива сме открили при редица локални и системни заболявания като пародонтоза, левкоплакия или метаболитен синдром (Soukup et al., 2012; Martinez et al., 2017; Yadav et al., 2020). В настоящето проучване не се установяват статистически значими различия между нивата на UA в слюнка в трите изследвани групи, но въпреки това, се очертава тенденция за намалението им при пациентите с НР(+) гастрит.

По отношение на серума, съществуват изследвания за НР инфекция като рисков фактор при различни заболявания и синдроми, при които се наблюдават и повишени нива на UA. При пациенти с хроничен НР(+) гастрит се откриват значимо повишени стойности както на UA, така и на общия холестерол, LDL-холестерол и отношението общ холестерол/HDL-холестерол, говорещи за дислипидемия и при двата пола (Ndebi et al., 2018). Инфекцията с НР води до увеличение на провъзпалителните фактори IL-1, IL-8 и TNF- α , които от своя страна предизвикват метаболитни промени и системни имунни отговори (Lu et al., 2018). Направен е опит да се докаже причинно-следствената връзка между повишени нива на UA и редица метаболитни нарушения като дислипидемия и нарушен глюкозен толеранс при миши модели (Lu et al., 2015). Авторите посочват, че увеличените нива на UA, чрез проинфламаторните си ефекти и цитокини активират NF- κ B пътя в мишия хипоталамус, което от своя страна води до възпаление на хипоталамуса и нарушения в нервно-ендокринната регулация. Интересно е, че тези автори откриват значимо по-високи нива на UA и при хора, при които чрез магнитен резонанс е доказана хипоталамична увреда в сравнение с индивиди с интактен хипоталамус. Li и сътр. (2019) намират по-високи серумни стойности на UA, които корелират с НОМА-IR индекса. При изследване на пациенти с ХБН на хронична хемодиализа и с доказани гастрити е установено, че имат по-високи серумни нива на UA в сравнение с болни с ХБН, но без гастрити. Приложението на инхибитор на протонната помпа или H₂-блокатор, значително понижава стойностите на UA в първата група (Tsukada et al., 2003).

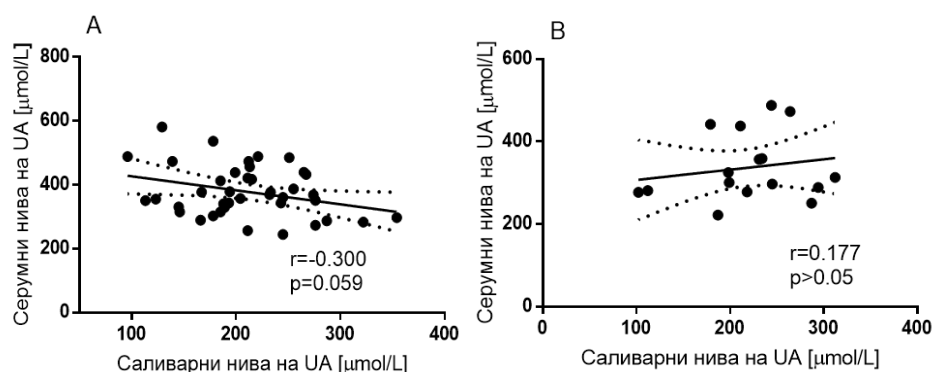
Нашето проучване установи статистически значими разлики в серумните стойности на UA при HP(+) гастрити ($382.0 \pm 78.7 \mu\text{mol/L}$) в сравнение както с контролната ($340.8 \pm 67.7 \mu\text{mol/L}$), така също и с HP(-) групи ($336.9 \pm 72.2 \mu\text{mol/L}$). Липсва статистическа значимост между нивата на UA в HP(-) и контролната група, което също е в потвърждение на литературните данни, че HP инфекция предизвиква не само локални възпалителни реакции, но и системни нарушения. Известен факт е, че съществуват полови вариации в серумните нива на UA, които се наблюдават и в настоящето проучване. На фиг. 13 са представени графично половите вариации, установени както за контролната група ($368.9 \pm 48.5 \mu\text{mol/L}$ UA за мъже vs $322.2 \pm 48.4 \mu\text{mol/L}$ UA за жени), така и за пациентската група ($377.5 \pm 76.4 \mu\text{mol/L}$ за мъже vs $331.0 \pm 129.2 \mu\text{mol/L}$ UA за жени).



Фигура 13. Зависимост на серумните нива на UA от пола. А. Контролна група (n=80). В Пациенти с HP (+) и HP(-) гастрит (n=60).
Приложен е параметричен t-тест.

По литературни данни съществува статистически значима умерена корелационна зависимост между нивата на UA в серум и тези в слюнка при здрави и млади индивиди (Riis et al., 2018; Bilancio et al., 2019). González-Hernández и сътр. (2019) също съобщават за позитивна статистически значима корелационна зависимост ($r=0.373$, $p=0.031$) между серумни и слюнчени нива на UA, изследвани при млади атлети на 60-та минута след физическото усилие. В настоящото проучване, при изследване на серумни и слюнчени нива на UA се откри както в контролната група, така и в групата с HP(-) гастрити статистически незначима и слаба позитивна корелационна взаимовръзка (съответно Pearson $r=0.175$, $p>0.05$ и Pearson $r=0.177$, $p>0.05$). За разлика от тях в групата с HP(+) гастрити се наблюдава умерена и негативна корелация (Pearson $r=-0.300$, $p=0.055$) с гранична стойност по отношение на статистическата значимост. Графическата зависимост за двете пациентски групи е представена на фигура 14. Проявявайки екстра-гастрални ефекти, HP инфекция вероятно предизвиква и системно възпаление и води до покачване на UA в серума. Логично е да се очаква, че

наблюдаваните високи серумни нива на UA при HP(+) гастрити ще обусловят и по-високите ѝ слюнчени нива в тази група. Такова увеличение обаче не се открива и дори се наблюдава тенденция за понижение, с което се обяснява и наблюдаваната негативна корелационна връзка между серумни и слюнчени нива на UA. Възможна причина за намалените нива на UA в слюнката е изчерпването ѝ в процеса на антиоксидантна защита срещу локалното възпаление, предизвикано от HP инфекция. Като съединение с най-голям дял от общия антиоксидантен капацитет на слюнката, UA е един от чувствителните биомаркери, показващ промени в хода на различни локални заболявания в резултат на възникнал оксидативен стрес. За разлика от повечето генерализирани патологични състояния (метаболичен синдром, дислипидемия и др.), при които се наблюдават повишени нива на слюнчената UA в резултат на нарастване на серумните ѝ стойности, при заболявания, които водят до локални възпалителни и дегенеративни промени се откриват обратни взаимоотношения. В подкрепа на резултатите от настоящето проучване са и данните на Yadav и сътр. (2020), които намират значимо по-ниски стойности на слюнчената UA при левкоплакия, лихен планус и OSCC.



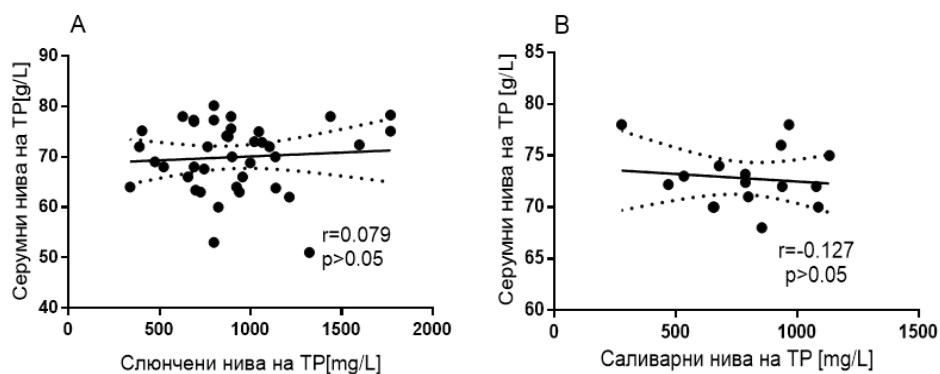
Фигура 14. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на UA в пациентските групи

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

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Общият белтък е основен компонент на слюнката, отговорен за повечето ѝ функции. Основните фактори, влияещи върху концентрацията на белтъка в слюнката са скоростта на слюнчения поток, секрецията на протеини от жлезите и креникуларната течност (Shaila et al., 2013). Диспепсията и болката са водещи синдроми при обострения хроничен гастрит и могат да повлияят на слюнчената секреция по пътя на стимулиране на симпатиковата нервна система. Острият и хроничен стрес предизвикват отделянето на по-малко количество слюнка, богата предимно на протеини, муцини и ензими (Keremi

et al., 2017). Ксеростомията е също често срещан симптом при пациенти с хроничен гастрит поради ефекта на лекарствата, използвани за лечението ѝ (Butylscopolamine, антибиотици, Drotaverine Hydrochloride, Omeprazole). Посочените причини вероятно обуславят и нашите резултати, сочещи по-високи стойности на ТР в слюнката на пациентите с НР(+) гастрити в сравнение с контролната група ($p=0.002$). Увеличението на слюнчения протеин вероятно отразява локална жлезиста секреция на протеини, участващи в специфичната и неспецифична имунна защита на гостоприемника в отговор на патогенния микроорганизъм (Shaila et al., 2013). Доколкото ни е известно, в научната литературата липсват данни относно промени в количеството на общия белтък в слюнка във връзка с НР(+) инфекция и вероятно нашето изследване е едно от първите в тази посока. Наблюдаваните различия в саливарните нива на ТР в изследваните групи не се откриват за ТР в серум. При изследване на връзка между серумни и слюнчени нива на ТР не се установява корелационна зависимост както в общата пациентска (Pearson $r=0.093$; $p>0.05$), така и в контролната група (Pearson $r=-0.098$; $p>0.05$). На фигура 15 са представени корелационните зависимости между серумни и слюнчени нива на ТР в групата на НР(+) гастрити (Pearson $r=0.079$; $p>0.05$) и тази на НР(-) гастрити (Pearson $r=-0.127$; $p>0.05$). Тези зависимости са статистически незначими. ТР в слюнка не е резултат от ултрафилтрацията на серума, а е резултат на увеличената му glandularна секреция при наличен локален възпалителен процес. Така леките различия, които се наблюдават в двете пациентски групи се дължат най-вероятно на различията в етиологията им и наличието на локални лигавични и секреторни промени при НР(+) гастрити.

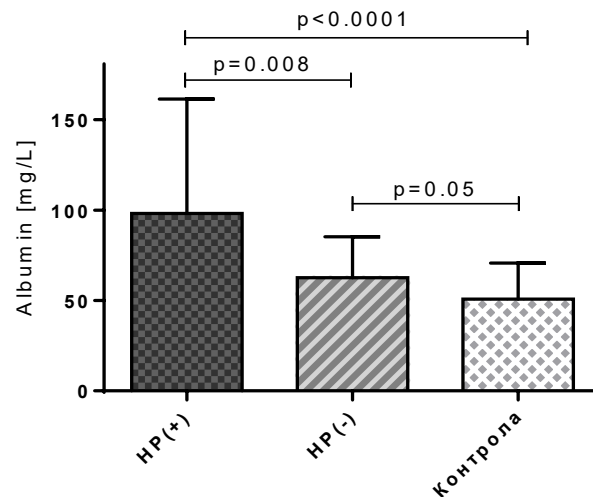


Фигура 15. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ТР в пациентските групи

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

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

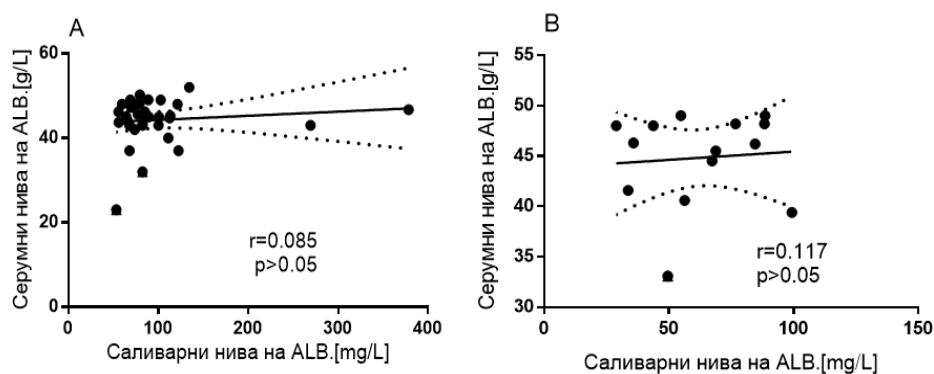
Албуминът е най-голямата фракция от общия белтък в серум и факторите, които регулират синтеза му са хранене, хормонален баланс и осмотично налягане (Rantonen and Meurman, 2000). За разлика от серума, в състояние на добро орално здраве албуминът в цяла слюнка представлява незначителна част от общия белтък, но въпреки това може да участва в антиоксидантната защита. Повишените стойности на ALB в слюнка при мукозит дават цялостна оценка за степента на възпаление на лигавицата, поради увеличената ѝ пропускливост и улеснена филтрация на албумин (Vaziri et al., 2009; Shahbaz et al., 2015). Затова при подбора както на контролната група, така и на пациентите са изключени от изследването лица с локално остро възпаление в устната кухина. В нашето проучване се наблюдава статистически значимо увеличение на албумина в HP(+) пациентската група в сравнение както с HP(-) пациенти с хронични гастрити, така и с контролната група (фиг. 16).



Фигура. 16. Албумин в слюнка в трите изследвани групи.
 HP(+) пациенти: n=44; HP(-) пациенти: n=16 и контролна група: n=80
 Приложен е One way ANOVA с корекция на Bonferroni

Освен това средните стойности на слюнчения албумин в HP(+) група е извън определените от нас референтни граници за този показател. В някои литературни източници се установява, че с напредване на възрастта стойностите на саливарния албумин постепенно нарастват, заради промени в съзъбието и съдовете на слюнчените жлези и механичното въздействие на мостове, частични протези и други дентални импланти (Shaila et al., 2013). В нашето проучване тези възрастови промени не се оказаха значими за здравата ни популация. Като се има предвид, че възрастови отличия между пациентите с хроничен гастрит и контролната група липсват (съответно 58.7 ± 12.1 и 56.9 ± 8.7 години, $p > 0.05$), а в самата пациентска група тези, които са с HP(+) инфекция са

относително по-млади от тези без НР инфекция (съответно 56.4 ± 12.1 и 60.8 ± 10.1 години, $p=0.25$), може да се заключи, че различията в стойностите на слюнчения албумин са по-скоро патогенетично, а не възрастово обусловени. Така този показател, заедно и с други утвърдени маркери, може да се окаже полезен при потвърждаване диагнозата хроничен гастрит и установяване на неговата етиология. Стойностите на серумния албумин са в референтни граници и за трите изследвани групи, като статистически значими различия се наблюдават единствено между НР(+) пациентска група и контролната група, дължащо се на факта, че албумин спада към групата на отрицателните острофазови белтъци и отразява системното влияние на НР инфекция. Заради статистически значимите промени в слюнчените нива на ALB, е очевидно, че локалното възпаление на ГИТ оказва по-силен локален ефект върху устната кухина чрез вариации във филтрацията на албумина през капилярите на слюнчените жлези. Това може да обясни наблюдаваните по-високите нива на албумин в слюнка. Както беше вече разгледано в т. 4-та от раздел IV (Резултати и обсъждане) на настоящия труд, липсва корелационна зависимост между серумните и слюнчени нива на албумин в референтната ни група ($n=186$, средна възраст 41.6 ± 8.9 години, Pearson $r=-0.061$, $p>0.05$), така и в подбраната спрямо пациентите с хронични гастрити контролна група ($n=80$, средна възраст 56.9 ± 8.7 години, Pearson $r=0.169$; $p>0.05$). На фигура 17 са посочени корелационните зависимости между серум и слюнка за албумин в двете пациентските групи, при които също липсва корелационна зависимост.



Фигура 17. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ALB в пациентските групи

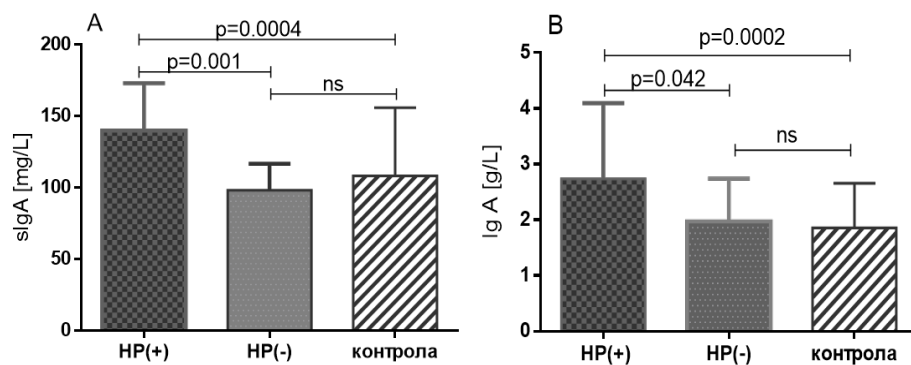
A. НР(+) пациенти: $n=44$; B. НР(-) пациенти: $n=16$

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Секреторният IgA (sIgA), като компонент на адаптивната имунна система, е преобладаващата форма на имуноглобулините и участва в специфични имунни реакции

за защита на лигавичните повърхности в ГИТ (Akhiani et al., 2005). НР е силно адаптиран към неблагоприятните условия в стомаха (изключително ниско рН на стомашния сок), което спомага интегрирането му в лигавичния слой и инфилтрирането в стомашната мукоза с неутрофили, лимфоцити, плазматични клетки, макрофаги и еозинофили (Akhiani et al., 2005). Въпреки стимулираното локално възпаление с производството на антитела тип IgA, имунният отговор на гостоприемника се оказва недостатъчно ефективен, поради което инфекцията с НР хронифицира (Wilson et al., 2007; Srivastava et al., 2013).

Установените от нас концентрации на sIgA в слюнката на изследваните лица в трите групи, както и концентрациите на IgA в серума са илюстрирани на фигура 18 (A,B).



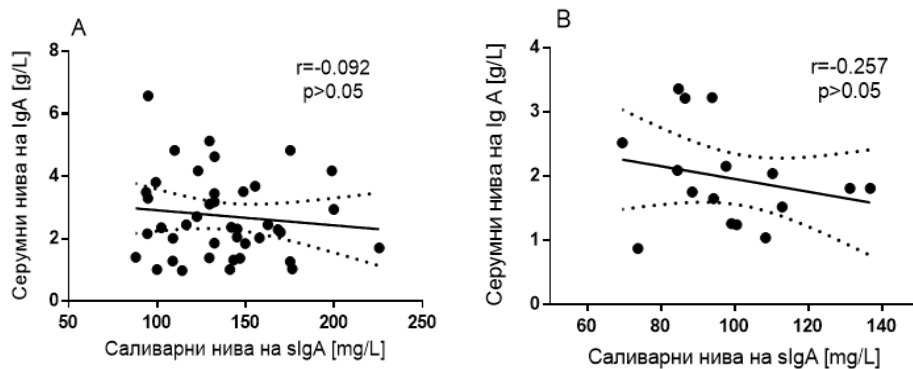
Фигура 18. Слюнчен sIgA (A) и серумни концентрации на IgA (B) в трите изследвани групи

HP(+) пациенти: n=44; HP(-) пациенти: n=16 и контролна група: n=80
Приложен е One way ANOVA с корекция на Bonferroni

В проучването си Kutuksuler и сътр. (1999), изследвайки с помощта на радиална имунодифузия sIgA, както и секреторния му компонент (SC) в слюнка и стомашен сок установяват статистически незначимо по-високи концентрации при 18 деца с HP(+) гастрит, в сравнение с тези при деца (n=12) без НР инфекция. За разлика от тях, в настоящето проучване резултатите показват значително повишени стойности на sIgA в слюнка при пациентите с HP(+) в сравнение с HP(-) и контролната група (табл. 31, фиг.18A). Това повишение вероятно се дължи на ролята на sIgA за намаляване на бактериалната плътност и активната хуморална защита на стомашната лигавица. Редица проучвания установяват, че локално произведените антитела, особено от тип IgA, могат да блокират инфекцията с НР. Доказано е, че sIgA предотвратява бактериалната колонизация, адхезия и засилва опсонизацията (Cerutti and Rescigno, 2008; Srivastava et al., 2013). По литературни данни се установява, че sIgA се увеличава с възрастта до 60- та

година и след това секрецията му намалява дори и при здрави индивиди (Jafarzadeh et al., 2010). Интересно наблюдение е, че най-ниски стойности на sIgA се наблюдават в HP(-) група (98.3 ± 18.0 mg/L). Трябва да се отбележи, че това е групата с най-широк възрастов диапазон (48-78 години), като 69% от индивидите в нея са над 60 год. Така възрастово обусловеното намаление на sIgA предполага по-лесна ранимост на лигавицата от различни токсични и исхемични нокси, водещи до хронични HP(-) гастрити. В литературата няма много данни относно количеството на sIgA при HP(+) гастрити, а се изследват най-вече нивата на слюнчените специфични антитела от IgA клас, насочени към причинителя (антитела към специфични антигени на HP, включително факторите на вирулентност CagA и VacA). Резултатите, касаещи серумните нива на IgA, са аналогични на тези в слюнка, като най-високи стойности се наблюдават в група с HP(+) гастрити, различаващи се значимо от стойностите му както в групата с HP(-) гастрити, така и в контролната група (табл. 32, фиг. 18B). Освен посочените по-горе статистически значими различия, е интересно да се подчертае, че средната стойност на sIgA в слюнка при HP(+) гастрити попада в горно-граничната област на определените от нас референтни граници и сравнително голяма част (38.6%) от индивидуалните стойности на sIgA в тази група са извън референтния интервал. За разлика от тях стойностите на IgA в серум и в трите изследвани групи попадат изцяло в референтния диапазон, определен от производителя на теста и по тази причина имат ниска диагностична значимост. *Така би могло да се твърди, че слюнченият sIgA е по-добър и неинвазивен биомаркер за отдиференциране на HP(+) от HP(-) гастрити в сравнение със серумния IgA и би могъл да бъде включен в панела от маркери, с които се мониторира пациентите с хронични гастрити.*

При направения корелационен анализ между нивата на серумния IgA и тези на слюнчения sIgA не се открива значима корелационна връзка, както в общата група пациенти с гастрити (Pearson $r=0.128$; $p>0.05$), така и в контролната група (Pearson $r=0.03$; $p>0.05$). На фигура 19 са представени графично корелационните зависимости в пациентските подгрупи с HP(+) и HP(-) гастрити. Отново се установява, че липсва корелационна зависимост между тези показатели.



Фигура 19. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на sIgA в пациентските групи

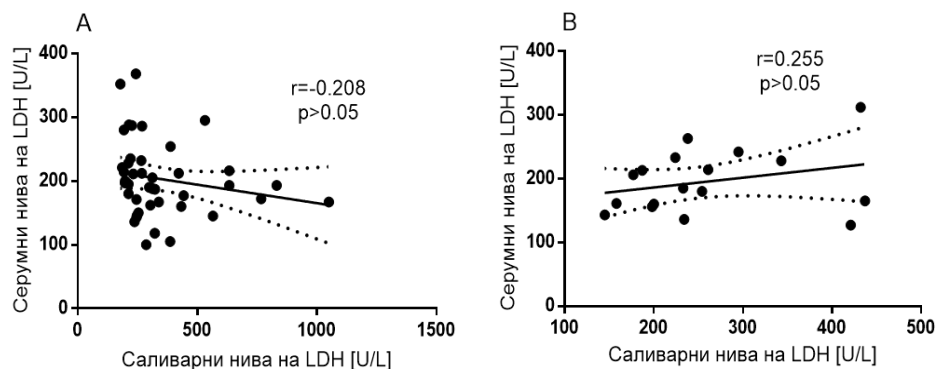
A. HP(+) пациенти: n=44; B. HP(-) пациенти: n=16.

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен корелационен Pearson r коефициент

Основни фактори за вирулентност на HP бактерии са вакуолизирацията цитотоксин A (VacA) и цитотоксин-асоциираният ген A (CagA). Установено е, че VacA причинява редица промени в прицелните клетки на гостоприемника, като клетъчна вакуолизация, деполяризация на плазмената мембрана, отделяне на епителните клетки от базалната им мембрана, автофагия, инхибиране на активността и пролиферацията на Т-клетките. Radin и сътр. (2011) доказват в клетъчни модели, че VacA е в състояние да причини апоптоза и смърт на стомашни епителни клетки. Това води до освобождаване на вътреклетъчната LDH и обуславя по-високи стойности на активността ѝ в извънклетъчната течност. Ето защо активността на ензима LDH в слюнка се явява полезен биохимичен маркер за некроза, не само в устна кухина, но и в стомашно-чревния тракт. Статистически значимо по-високите стойности на LDH както при HP(+), така и при HP(-) пациенти спрямо контролните индивиди (съответно $p < 0.0001$ и $p = 0.004$) потвърждават този факт. Нашите резултати се подкрепят и от изследването на Motamedi и сътр. (2013), които установяват значимо по-високи стойности на ензима в слюнката на пациенти с хроничен гастрит и язва, без да е уточнена тяхната етиология. Интересно е да се отбележи, че се откриват статистически значимо по-ниски стойности на слюнчената LDH в групата с HP(-) гастрити в сравнение с тези от групата на HP(+), гастрити (съответно 261.0 ± 94.0 U/L и 345.9 ± 193.4 U/L, $p = 0.010$). Това най-вероятно говори за по-тежко степенните лигавични увреди при HP(+), гастрити. Аналогични промени, подобни на тези в слюнката, се установяват и в серумните стойности на LDH: и двете пациентски групи с HP(+), и HP(-) гастрити имат статистически значимо по-високи нива на ензима в сравнение с тези на контролната група (съответно $p = 0.012$ и $p = 0.046$), макар че остават в референтните

граница на лабораторния метод, определен от производителя на теста, но помежду си двете пациентски групи не се различават ($p=0.842$). По тази причина те имат ниска диагностична значимост. За разлика от тях, средните стойност на LDH в слюнка при пациентите с HP(+) хронични гастрити попадат в горно-граничната област на определените от нас референтни граници, а една пета от индивидуалните стойности на ензима в тази група са извън референтния интервал. Това дава основание да се предложи слюнчената LDH като добър и неинвазивен биомаркер при доказване на възпалителни лигавични увреди в устната кухина в резултат на възпаление на ГИТ. Значимостта на различията в двете пациентски групи е повод да се предложи слюнчената LDH също и като показател, който може да отдиференцира хроничните гастрити според етиологичния фактор.

На фигура 20 е представен графичният израз на корелационните зависимости между серумните и слюнчени нива на ензима LDH в двете пациентски групи. И при тях, както и в контролната (Spearman $r=0.084$, $p>0.05$) и референтната (Spearman $r=0.123$, $p>0.05$) групи липсва значима корелационна зависимост.

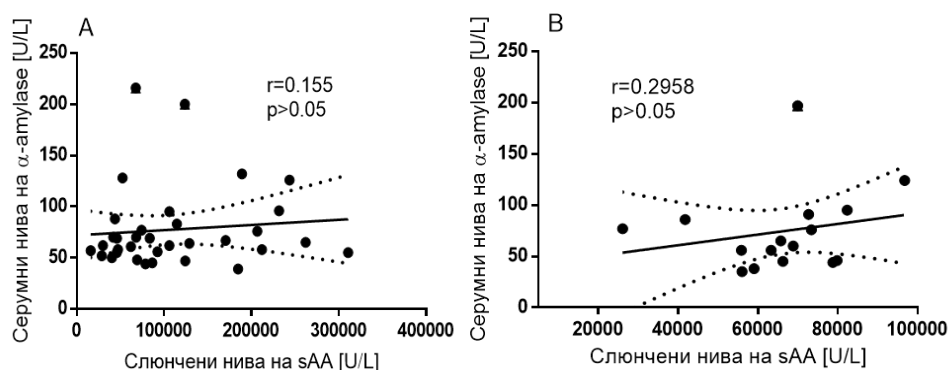


Фигура 20. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на LDH в пациентските групи

A. HP(+) пациенти: $n=44$; B. HP(-) пациенти: $n=16$. Приложен е непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman r коефициент

Слюнчената амилаза (sAA) е един от най-широко вариращите показатели в саливарната течност, влияеща се от множество фактори. Секрецията на sAA в слюнчените жлези е подчинена много повече на психо-невроендокринното въздействие на стреса, отколкото на вариации в дебита и на възрастта (Arhakis et al. 2013). В настоящето проучване се наблюдава висока активност на ензима, надскачаща определените от нас референтни граници за групата с HP(+) хронични гастрити и различаваща се статистически значимо от активността на ензима както в групата с HP(-)

хронични гастрити, така и в контролната група (табл. 31). Motamedi и сътр. (2013) също наблюдават значително по-висока активност на sAA при пациенти с язвена болест с неуточнена етиология отколкото тази при здрави индивиди. Вероятно е, диспептичните прояви и болковия синдром при тези заболявания да водят до стресово стимулирана слюнчена секреция на ензима. За разлика от sAA стойностите на серумната алфа-амилаза при здрави лица варират в значително по-тесни граници и са приблизително 1000 пъти по-ниски от тези в слюнката. Тя е представена от два изоензима: панкреасен (P-тип) $\approx 40\%$ и слюнчен (S-тип) $\approx 60\%$. В серума циркулира незначителна част от слюнчения изоензим, независимо от високите му нива в слюнката, тъй като се инактивира и разгражда в стомаха от стомашната киселина и пептидази. Макар и рядко, описани са интересни казуси на индуциран от НР хроничен панкреатит с повишение на серумните стойности на алфа-амилазата, очевидно за сметка на панкреасната изоформа (Rieder et al., 2007; Vulajic et al., 2014). В настоящето проучване активността на алфа-амилазата в серум е в референтни граници, като не се установяват статистически значими разлики между трите изследвани групи. Въпреки, че НР инфекция води до значимо повишени слюнчени нива на ензима, това не се отразява на серумните му нива, което е едно допълнително доказателство за стресово индуцираната му секреция от слюнчените жлези, а не на тяхната деструкция. Това от своя страна може да обясни липсата на корелационна взаимовръзка между серумните и слюнчени нива на ензима при пациентите с хронични гастрити (фиг. 21А и В). В контролната група също липсва корелационна взаимовръзка (Spearman $r=-0.086$, $p>0.05$).



Фигура 21. Корелационна зависимост между саливарните и серумни нива на ензима алфа-амилаза в пациентските групи

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

Слюнчените жлези и оралната микрофлора имат съществено значение за поддържане хомеостазата на азотния оксид (NO). При здрави лица нитритът, присъстващ в погълнатата слюнка, се превръща в азотен оксид под въздействие на солната киселина в стомаха. Редица проучвания доказват, че образуването на слюнчен нитрит с помощта на симбиотичните факултативни анаеробни бактерии в орофаринкса, засилват антимикробната активност на стомашния сок (Dykhuisen et al., 1998). Това е неензимният път за синтез на азотен оксид, за сметка на приетите с храната нитрати, за разлика от класическия (ендогенен) път, в който участие вземат NO-синтази. Поради зависимостта от постъпленията им с храната, биологичните проби за определяне концентрацията на нитрат/нитрит задължително се вземат на гладно. Азотните съединения имат полуживот от 5 до 6 часа, затова базисните им нива на гладно са най-подходящи за сравнение (Craig et al., 2000; Bondonno et al., 2015). Резултатите от настоящето проучване показват, че стойностите на нитритите в слюнка са най-високи в групата на НР(+) гастрити и са статистически значимо различни спрямо нитритите в останалите две групи. Освен това средната им стойност попада извън определените от нас референтни граници за този показател. Повишената концентрация на нитрити в слюнката вероятно е защитен отговор на гостоприемника срещу патогенния организъм. Още през 1998 година Dykhuisen и сътр. доказват, че добавянето на нитрит (1000 $\mu\text{mol/L}$) към разтвори с pH=2 води до пълно унищожаване на НР в рамките на 30 минути. Генерираните при тази неензимна реакция реактивни азотни съединения (RNS – напр. пероксинитрит, NO-радикал и др.) притежават цитотоксични свойства и антибактериалните им ефекти са свързани с механизма на инхибиране на съществения за метаболизма на НР бактерии ензим уреаза. Авторите доказват, че антимикробният ефект на нитритите зависи от дозата му и НР се унищожават напълно при нива $\geq 500 \mu\text{mol/L}$. Концентрацията на нитрити в човешката слюнка варира в широки граници от 50 до 1000 $\mu\text{mol/L}$, зависи най-вече от приема на нитрати с храната, докато тези в стомашния сок са значително по-ниски, поради възможността да се редуцират до азотни оксиди (NO, NO₂). Установено е също, че ентеро-саливарната циркулация на нитратите има отношение към поддържане дебелината на стомашната мукоза и повишаване устойчивостта ѝ към патогени (Vjörne et al., 2004). Възпалителният процес, причинен от НР води до инфилтрация в стомашната мукоза на лимфоцити и макрофаги и тяхното активиране, което стимулира експресията на индуцируемата NO-синтаза (iNOS). Това се съпровожда с повишени нива на циркулиращи нитрати и нитрити (Cherdantseva et al., 2014). iNOS е свързана с производството на NO, който е фактор на кислород-зависимата

система за антивирусна и антибактериална защита на макроорганизма, но повишената ѝ експресия води до натрупване на свободни радикали в тъканите, обостря възпалението и нарушава процесите на регенерация.

Интригуващ е фактът, че нивата на нитрити при НР(-) пациенти (групата с най-висока средна възраст) са ниски и неотличаващи се от тези в контролната група. Различната етиология, несвързана с НР инфекция, на този тип хронични гастрити вероятно не води до индуциране синтезата на iNOS и съответно до липсващо нарастване на нитритите. *Повечето намерени данни в литературата са свързани със стомашните нитрити, асоциирани с НР инфекция, докато информация за стойностите им в слюнка липсва.*

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

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

Многобройните структурни и функционални взаимодействия на различните клетъчни елементи способстват интегритета на оралната мукоза и противопоставянето ѝ на различни химически, микробни и физически екзогенни патогени. Постоянното обновяване на епителните клетки е важен фактор, необходим за поддържането на орално-стомашната лигавична бариера. Устната кухина се явява входна врата за проникване на НР бактерии в храносмилателната система, а често и огнище за реинфекция. При възпалителната реакция, предизвикана от НР, макрофагите и PMNs клетки инфилтрират мукозата и освобождават вазоактивни агенти и провъзпалителни медиатори, които увреждат епителните клетки и влошават микроциркулацията на лигавицата.

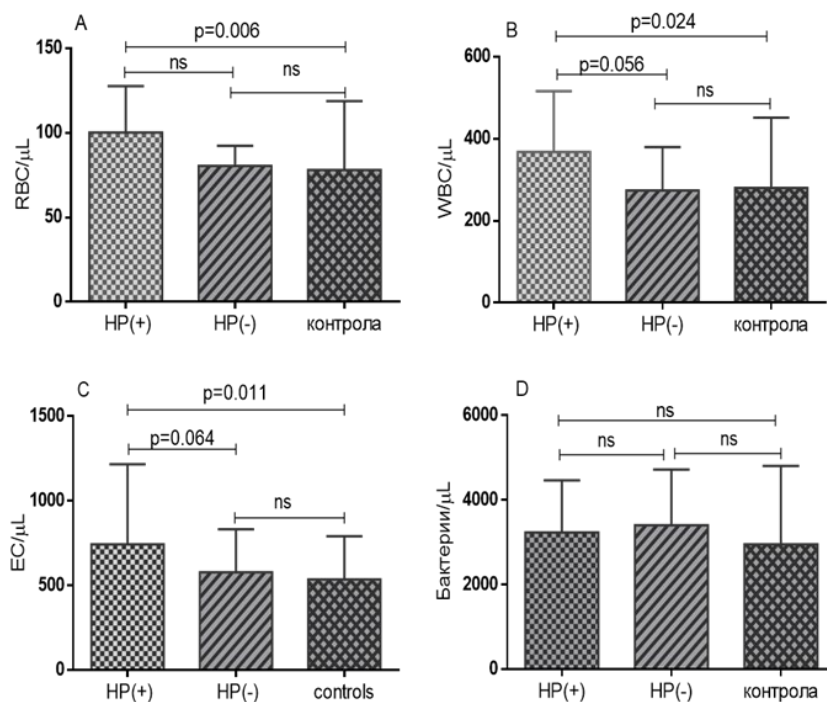
Резултатите от определяне на броя на клетките в нестимулирана слюнка при всички изследвани групи са представени на таблица 34 и визуализирани на фигура 22.

Таблица 34. Брой на клетъчните елементи в нестимулирана слюнка в трите изследвани групи

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

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

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



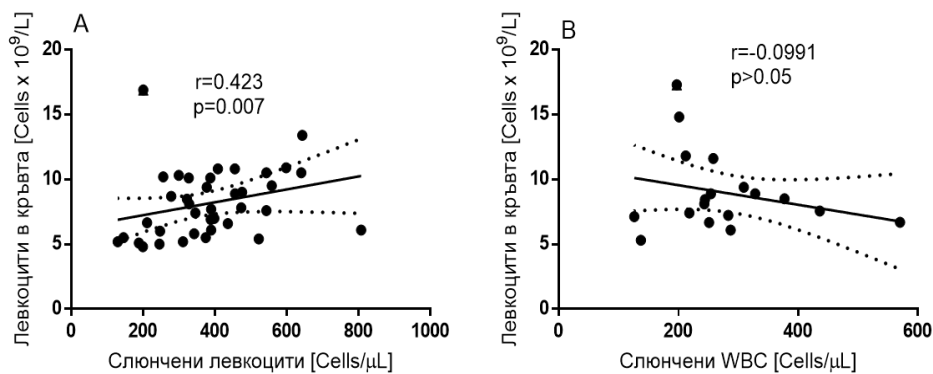
Фигура 22. Брой на клетъчните елементи в слюнка в трите изследвани групи:
 А. Еритроцити, В. Левкоцити, С. Епителни клетки и D. Бактерии
 HP(+) пациенти: n=44; HP(-) пациенти: n=16; контролна група: n=80
 Приложен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni

Обсъждане на резултатите

Наблюдаваните различия в броя на клетъчните елементи вероятно се дължат на хроничния възпалителен процес чрез повлияване конфигурацията на клетъчно-клетъчните връзки, дехидратацията, неправилното хранене и дисбактериоза. Липсата на различия в броя на клетъчните елементи между групата с HP(-) гастрити и контролната група навежда на мисълта, че етиологичният фактор, а именно HP инфекция, вероятно играе съществена роля по отношение на тези различия.

Левкоцитите и епителните клетки, като основни компоненти на лигавичната епителна бариера, са най-засегнати при физиологични и патологични състояния. Хроничният гастрит може да се съпровожда и с левкоцитоза като обща възпалителна реакция на организма. При направения статистически анализ за взаимовръзка между общия брой на циркулиращите левкоцити в кръвта и броя на левкоцитите в слюнката в двете пациентски групи се установява статистически значима умерена корелация в групата с HP(+) гастрити, докато в групата с HP(-) гастрити такава връзка липсва. В последната група дори се забелязва, макар и статистически незначима тенденция за обратна корелация, която най-вероятно се дължи на по-високата възраст на пациентите,

както и съпътстваща коморбидност, довела вторично до развитие на хроничен гастрит и липсващо локално засягане тъканите на оралната кухина (фиг. 23)

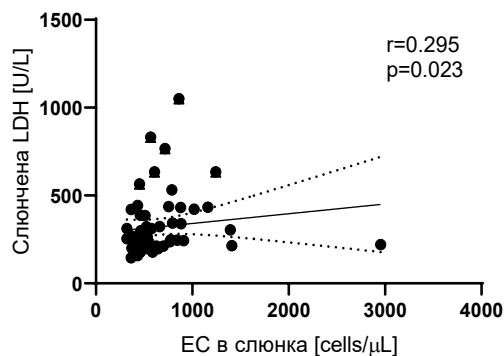


Фигура 23. Корелационна зависимост между броя на левкоцитите в слюнка и кръв при пациентите с хроничен гастрит

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

Приложен е непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman *r* коефициент

Епителните клетки притежават метаболитна активност и реагират на външни стимули чрез синтез на различни цитокини, адхезионни молекули, растежни фактори, хемокини и матриксни металопроотеази (Alzahrani et al., 2014; Groeger and Meyle, 2019). Wagner и сътр. (1997) предоставят доказателства в подкрепа на хипотезата, че *HP* бактерии са в състояние директно да индуцират апоптоза на мукозните епителни клетки. Това би довело до повишеното им излющване и попадане в слюнката. Тази хипотеза се потвърждава с установените статистически значимо по-високи стойности на епителните клетки в двете групи с хроничен гастрит (744.2 ± 638.4 клетки/ μL за *HP*(+) гастрити и 579.9 ± 253.7 клетки/ μL за *HP*(-) гастрити). Интересно е да се подчертае, че единствено и само този вид клетки попада извън референтния диапазон на определените от нас референтни граници за групата на *HP*(+) гастрити. Като се има предвид, че слюнчената LDH е с произход основно от разрушените клетки на сквамозния епител, е обяснима наблюдаваната статистически значима корелационна зависимост между слюнчената LDH и броя на епителните клетки в оралната течност в групата с *HP*(+) гастрити (фиг. 24).



Фигура 24. Корелационна зависимост между броя на ЕС и активност на LDH в слюнка при пациенти с НР(+) гастрити

Приложен е непараметричен корелационен анализ и изчислен Spearman r коефициент

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

Изследването на оралната течност по отношение на клетъчния ѝ състав представлява интересно предизвикателство. В литературата не са намерени достатъчно данни, свързани с промени в клетъчния състав на слюнката както в норма, така и при различни системни заболявания, включително и хроничните гастрити. Данни се откриват единствено за локални възпалителни процеси като гингивити и пародонтоза. Понастоящем повечето изследвания, свързани НР инфекция и използващи слюнката, като неинвазивен биологичен материал, се отнасят най-вече до доказване на етиологичния причинител посредством PCR технология (Goud et al., 2019), а не за изследване на клетъчните елементи. Вероятно настоящото проучване е едно от първите, което е поело в тази посока.

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

Оксидативният стрес играе съществена роля в патогенезата на хроничното възпаление и дегенеративните промени в стомашната лигавица, причинени от НР инфекция. Стомашно-чревният тракт е предразположен към атака на ROS, тъй като директно контактува с външната среда. Самият храносмилателен процес, лигавичната имунна система и коменсалната микрофлора са потенциални източници на ROS. Гастритът се характеризира с хроничен неспецифичен възпалителен процес на стомашната лигавица с дифузен и локален характер, който постепенно води до атрофия. Множество ендогенни и екзогенни фактори са причина за гастрит и пептична язва с образуване на свободни радикали (храна, йонизиращо лъчение, инфекции, исхемични състояния и други).

Оценяването на баланса между оксиданти и плазмения антиоксидантен капацитет при гастритите позволява по-пълното изясняване на патофизиологичното действие на НР инфекция по отношение поддържане на хроничното възпаление. С тази цел са изследвани двата теста d-ROMs (Реактивни кислородни метаболити), като показател за генериране на ROS и BAP (Биологичен антиоксидантен потенциал), като показател за общ антиоксидантен капацитет на серума. Резултатите за трите изследвани групи са посочени на таблица 35, а сравнителният анализ между тях е илюстриран на фигури 25 и 26.

Таблица 35. Серумни нива на ROS, измерени чрез dROMs тест и AOC, измерен чрез BAP тест в изследваните групи

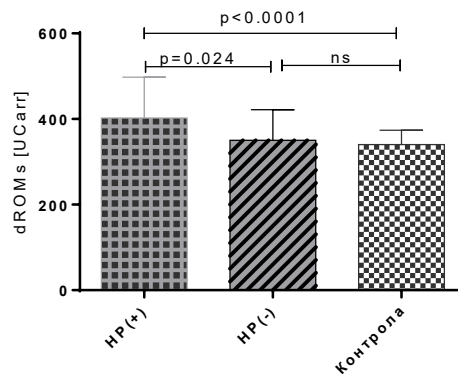
Параметри (мерна единица) Референтни граници	НР(+) пациенти (mean±SD)	НР(-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	P value
*dROMs [Ucarr] (252.4÷463.5)	402.5±95.4	350.3±71.2	337.7±35.24	<0.0001
**BAP [µmol/L] (2210÷3400)	2258±295.5	2440±212.2	2624±279.9	<0.0001

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи по отношение на генериране на ROS (dROMs тест) и AOC (BAP тест) е осъществен с One way ANOVA)

**Референтните граници за ROS (dROMs тест) са 250÷300 UCARR, а **оптималните нива за AOC (BAP тест) са >2200 µmol/L, според производителя на теста.*

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

пациенти са предимно с гастрит от група C, индуциран от лекарства, диетични разстройства и локални исхемични лигавични промени, вторично обусловени от коморбидни състояния. Независимо от наличието на клинични гастритни оплаквания, прави впечатление, че нивата на ROS в индивидите от HP(-) групата не се различават статистически от тези в контролната група. HP бактерии очевидно предизвикват в по-голяма степен генериране на ROS в сравнение с другите етиопатогенетични фактори, отговорни за HP(-) гастрити. Така HP инфекция е основният фактор, предопределящ статистически значимите различия между изследваните групи, представени на фиг. 25.



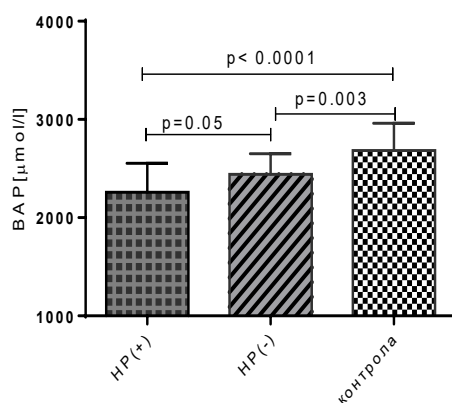
Фигура 25. Сравнение на нивата на генерираните ROS, измерени чрез dROMs в трите изследвани групи

Приложен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni
(dROMs – Реактивни кислородни метаболити)

В потвърждение на резултатите от настоящето проучване са и множество данни от литературата. Редица проучвания показват, че инфекцията с HP е свързана с генерирането на свободни радикали, което води до оксидативен стрес в стомашната лигавица (Fukuhara et al., 2008; Li et al., 2001; Baik et al., 1996). При колонизацията ѝ, HP бактерии предизвикват силна възпалителна реакция, характеризираща се хистологично с повърхностна епителна дегенерация и инфилтрация на мукозата от възпалителни клетки. Хистологичните изследвания при пациенти с хроничен гастрит установяват, че степента на инфекцията с HP и тежестта на увреждане на лигавицата са пряко свързани с повишената неутрофилна инфилтрация на лигавицата (Danese et al., 2001). Полиморфонуклеарните клетки (PMN), макрофагите и лимфоцитите, инфилтрират lamina propria и интраепителиално пространство. Произвеждайки цитокини и други медиатори на възпалението те генерират и натрупват ROS, като предизвикват окислително увреждане на различни макромолекули от стомашната лигавица.

Изразените лигавични промени са свързани с цитотоксин-асоциирания ген А (CagA) и вакуолиращия цитотоксин VacA, които определят по-голямата вирулентност на HP бактерии и тежест на заболяването. (Pich and Merrell, 2013). CagA щамовете показват засилен оксидативен взрив в PMN (Zhang et al., 1996). Установено е, че приблизително 50% от HP щамове произвеждат и двата цитотоксина (Cover, 1996, Jones et al., 2010). Song-Ze Ding и сътр. (2007) експериментално установяват вътреклетъчно натрупване на ROS в заразените с HP епителни клетки и това представлява важен механизъм, водещ до увреждането им.

Успоредно с повишението на ROS, намалява и антиоксидантният капацитет, измерен чрез ВАР теста. Това е най-силно изразено при HP(+) пациенти (табл. 37). Интересно наблюдение е, че има статистическо значимо различие и между контролната група и пациентите с HP(-) гастрити. Вероятно придружаващите заболявания, характерни за HP(-) група, способстват за намалението на антиоксидантния капацитет (фиг. 26).



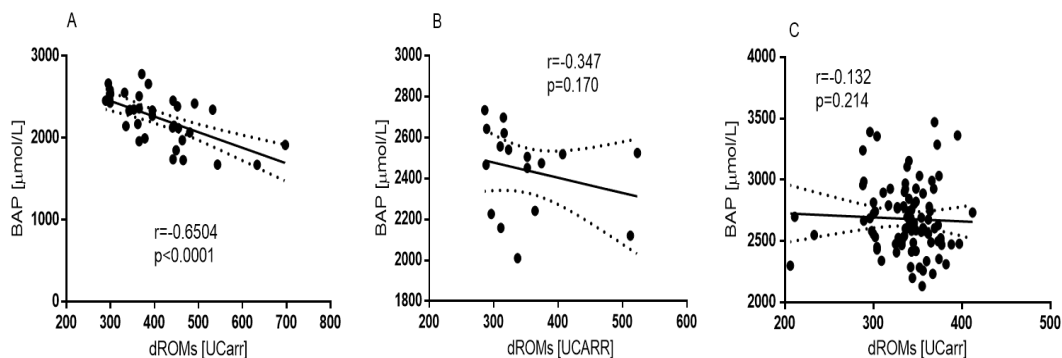
Фигура 26. Сравнение на нивата на антиоксидантния капацитет, измерени чрез ВАР в трите изследвани групи

*Приложен е One way ANOVA с корекция на Bonferroni
ВАР- Биологичен антиоксидантен потенциал*

Въпреки, че средните стойности на АОС при HP(+) остават в границите на референтния интервал, при 27% от пациентите се наблюдават стойности под този интервал. Вероятно богатият набор от клетъчни и извън клетъчни антиоксиданти успява да поддържа баланса ROS/АОС и да предотврати възникването на ОС. При HP гастрити са установени значимо намалени нива на един от важните антиоксидантни ензими – супероксид дисмутаза (SOD), която играе основна роля за неутрализиране на супероксидните радикали при неутрофилната възпалителна инфилтрация (Naito et al.,

1992; 2007). Освен ендогенните антиоксиданти важна роля имат и приетите с храната екзогенни антиоксиданти (витамини А, С, Е; флавоноиди; селен и др.). Установено е, че НР инфекция води до изчерпване на витамин С в окислително-редукционните реакции в условия на повишено генериране на ROS (Dovhanj et al., 2009). При заразените индивиди се наблюдава значително понижаване на нивата на витамините Е и С (Mei et al., 2018). Потенциалните фактори като недोхранване или малабсорбция водят до липсата на всмукване на ценни витамини и микроелементи.

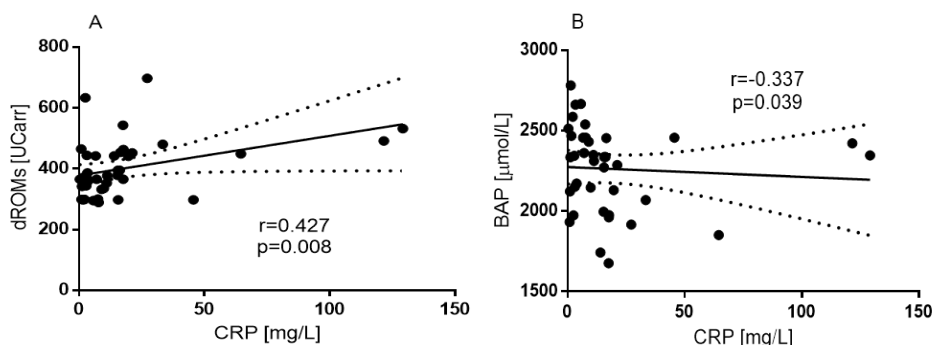
И според Bhattacharyya и сътр. (2014) възпалителната реакция при НР инфекция с генериране на ROS води до бързо изчерпване на антиоксидантите. Тази взаимоотношаваност между двата показателя се доказва и в настоящето проучване с установената отрицателна корелация при трите изследвани групи, онагледена на фигура 27 (А,В,С). Логично е тази корелация да е висока и статистически значима за групата с НР(+) гастрити. Силата на корелацията намалява и е статистически незначима за останалите две групи.



Фигура 27. Корелация между нивата на генерираните ROS и АОС, измерени съответно чрез dROMs и BAP тестове при А. НР(+) пациенти: n=44; В. НР(-) пациенти: n=16 и С. контролна група: n=80

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент

Доказаните както повишено генериране на ROS, така и намален АОС при НР(+) гастрити корелират в умерена степен, съответно положително и отрицателно, със серумните нива на CRP като основен възпалителен биомаркер (фиг. 28 А,В).



Фигура 28. Корелация между серумните нива на CRP и ROS (A) и серумните нива на CRP и AOC (B) при HP(+) гастрити

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент

5.5. Корелационни зависимости между ендоскопските промени в стомаха и изследваните параметри в слюнка и серум

Изследване на серумни нива на CRP и желязо при пациентите с хронични гастрити

Резултати и обсъждане

Като острофазов белтък, CRP е утвърден лабораторен показател за оценка на остро възпаление. Множество изследвания са правени относно промяна в нивата му и при хронични възпаления. Така например хроничното възпаление и високите нива на CRP в плазма са силен независим предиктор за системни и кардиоваскуларни заболявания и инсулинова резистентност (Desai and Mathews, 2014). Въпреки че HP бактерии предизвикват хронична възпалителна реакция при почти всички заразени индивиди, при много от тях не се развиват ясно изразени клинични признаци на инфекция (Pich and Merrell, 2013). Затова изследването на CRP успешно може да служи като маркер за оценка на хронично тлеещото възпаление в стомашната мукоза и рутинно се използва в клиничната лаборатория. Освен това е установено, че по-тежките нарушения и възпаления на стомашно-дуоденалната лигавица като пептични язви и ерозивен пангастрит се асоциират с по-високи нива на CRP (Altun et al., 2019). Резултатите от изследването на CRP в настоящето проучване са посочени в таблица 36.

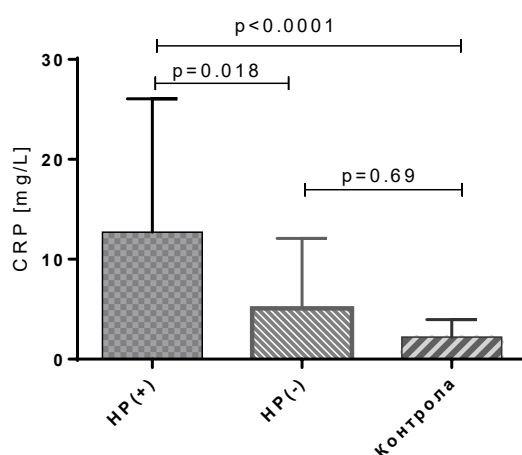
Таблица 36. Серумни нива на CRP в трите изследвани групи

Параметър (мерна единица)	HP(+) пациенти (mean±SD)	HP(-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
*CRP [mg/l]	18.6±15.0	5.7±9.7	2.4±1.6	<0.0001

Сравнителният анализ на различията в трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA

*CRP референтни граници до 5 mg/L

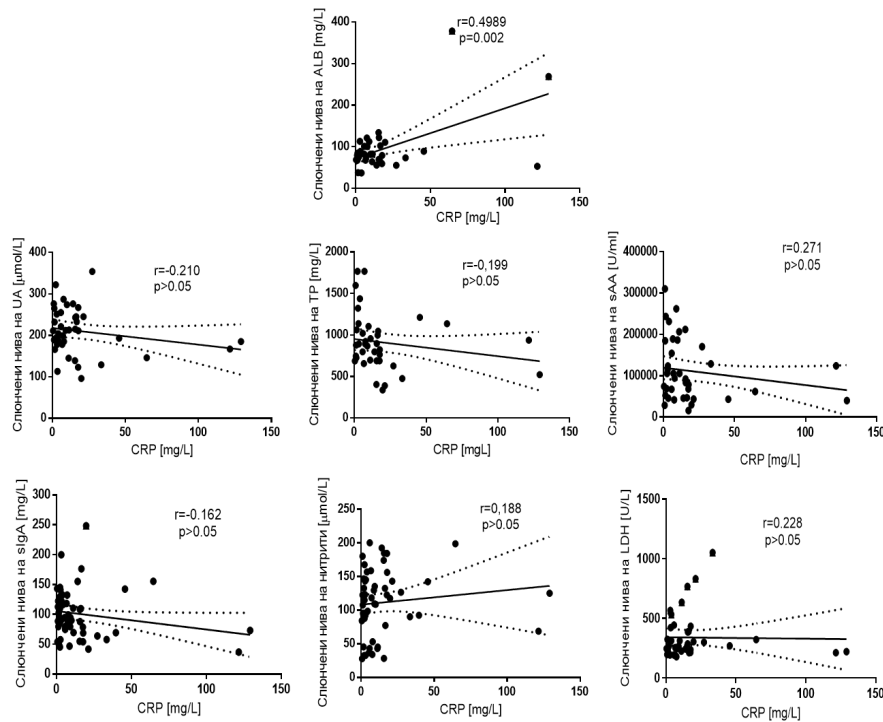
В двете изследвани пациентски групи има установено хронично възпаление и е логично в тези групи стойностите на CRP да са значимо по-високи от тези в контролната група. По-интересен е фактът, че стойностите на CRP в групата на HP(+) гастрити са многократно и значимо по-високи от тези при пациентите с HP(-) гастрити (фиг. 29). Би могло да се лансира хипотезата, че не само хроничният възпалителен процес, но и етиологичният фактор, който го обуславя, играе определяща роля при индукция синтеза на CRP. Етиологичният фактор в групата на HP(-) гастрити е неинфекциозен и възможността за увеличена синтеза на CRP в условията на този тип хронично възпаление е многократно по-ниска.



Фигура 29. Сравнение на серумните нива на CRP в трите изследвани групи
Приложен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni

В литературата се откриват данни, доказващи слабо до умерено изразена корелационна връзка между нивата на CRP в плазмата с тези в слюнката (Out et al., 2012). Поради този факт, слюнката се предлага като неинвазивен биологичен материал за оценка на риска от атеросклероза и остър коронарен синдром, като едни от най-широките възпалителни заболявания (Miller et al., 2010). Основен проблем при изследването на CRP в слюнка са изключително ниските му стойности от порядъка на 117.69 ± 24156.00 pg/ml (Ouellet-Morin et al., 2011), което изисква специално разработени методи/платформи, както и множество фактори (недобра възпроизводимост на резултатите поради сложността на слюнчената матрица, недоизяснен механизъм на навлизане на молекулата от серума и наличие на микробиални протеази, разграждаща бързо белтъка), които предопределят широките му вариации (Pay and Shaw, 2019). По тази причина CRP в слюнка не е изследван в настоящето проучване, но са изследвани

корелационните зависимости между серумни нива на CRP и различни параметри в слюнка в групата с HP(+) хронични гастрити, представени на фигура 30.



Фигура. 30. Корелационни зависимости между серумни нива на CRP и биохимични параметри, изследвани в слюнката

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

Установява се умерена и статистически значима позитивна корелация единствено между слюнчените нива на албумин и тези на серумния CRP, което е *породно доказателство* за значимостта на слюнчения албумин при изследване на HP(+) пациенти.

Хроничният гастрит и пептичната язвена болест са известни етиологични причини, водещи до желязодефицитна анемия. Желязото е основен жизненоважен микроелемент за почти всички организми, включително и за HP бактерии. Средните стойности на серумните нива на желязо в трите изследвани групи са посочени в таблица 37. Прави впечатление, че в групата на HP(+) гастрити стойностите на серумното желязо са най-ниски и въпреки че са все още в референтния диапазон, заемат долнограничната му област.

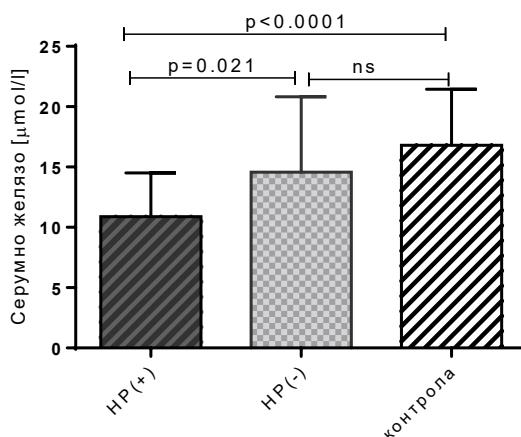
Таблица 37. Серумни нива на желязо в изследваните групи

Параметър (мерна единица)	НР(+) пациенти (mean±SD)	НР(-) пациенти (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
*Серумно желязо [μmol/L]	10.9±3.6	14.6±6.2	16.8±4.7	<0.0001

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с *One way ANOVA*

*Използваният метод за определяне на серумно желязо е с референтните граници 10.6÷32.0 μmol/L, валидни и за двата пола.)

За установяване на значимостта на различията между отделните групи е проведен *One way ANOVA* с корекция на Bonferroni, чиито резултати са представени на фигура 31. Нивата на серумното желязо в групата на пациентите с НР(+) гастрити са статистически значимо по-ниски в сравнение с тези както в групата на НР(-) пациенти, така и в контролната група, като в последните две групи липсва статистическа значимост. Твърде вероятна причина за наблюдаваните статистически значими различия между серумните нива на желязо в двете пациентски групи е етиологичният причинител за хроничния гастрит.

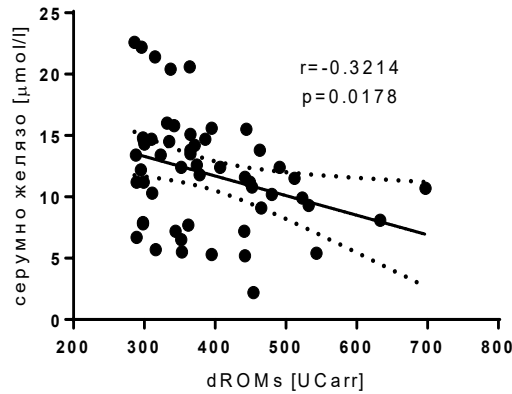


Фигура 31. Сравнение на нивата на серумното желязо в изследваните групи

Приложен с *One way ANOVA* с корекция на Bonferroni

При НР инфекция съществува конкуренция между микроорганизма и гостоприемника за желязните катиони. Според Dovhanj и сътр. (2009) микроелементът желязо има двойка роля – от една страна играе роля на кофактор за няколко ензима в НР бактерии, важни за адаптирането му към киселата среда в стомаха, а от друга страна катализира образуването на токсични хидроксилни ROS. Внесеното с храната желязо е в около 80% под нехемова форма и редуцирането на ферри йоните (Fe^{3+}) до феро йони (Fe^{2+}) е от съществено значение за усвояването му в организма. Ниското рН и действието на

храносмилателните ензими в стомашния лумен спомагат за този процес. Проучвания показват, че НР инфекция води до повишени концентрации на IL-1 или TNF-alpha в стомашния сок, което предизвиква потискане секрецията на стомашна киселина, необходима за усвояването на желязото (Nikolaos et al., 2016). Други проучвания установяват връзка между намаляването на аскорбиновата киселина и хипоацидитета в стомаха при инфекцията с НР (Cardenas et al., 2006; Annibale et al., 2003). НР бактерии и гостоприемникът се „състезават“ за усвояването на желязото от стомашен лумен. Има доказателства, че чрез този механизъм на конкуренция и наличието на регулатор, отговорен за поемането на желязо (ferric uptake regulator – FUR) в НР бактерии, микроорганизмът може да причини дефицит на микроелемента в гостоприемника, особено ако е наличен и прием на храна, бедна на желязо (Pich and Merrell, 2013). Освен това FUR функционира като главен регулатор на генната експресия на множество белтъци и ензими, имащи отношение към метаболизма и енергетиката на НР бактерии, включително и на CagA. CagA, от своя страна, играе също важна роля за поддържане хомеостазата на желязото в НР бактерии, чрез промяна на желязния метаболизъм в ендотелните гастрални клетки на гостоприемника (Flores et al., 2017). Всеизвестен е фактът, че свободното желязо, несвързано с белтък, участва в реакцията на Fenton и стои в основата на запускане на процесите на генериране на ROS. *Твърде възможно е промяната в желязния метаболизъм на гостоприемника, вследствие на НР инфекция, да довежда до повишени нива на свободното, несвързано с белтък желязо, въпреки намаляването на общата му серумна концентрация.* В подкрепа на тази хипотеза е и изследваната корелационна зависимост между серумни нива на желязо и генериране на ROS в групата с НР(+) гастрити, онагледена на фигура 32. Тази зависимост е не само отрицателна и статистически значима, но умерена по сила. Промените в хомеостазата на желязото, причинени от НР инфекция, увеличават чувствителността на макроорганизма към окислително увреждане на стомашната лигавица.



Фигура 32. Корелационна зависимост между серумни нива на желязо и серумни нива на ROS при пациенти с HP(+) гастрити

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

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

Резултатите от извършения корелационен анализ между основните параметри, изследвани в слюнката, и степента на ендоскопската увреда са показани на Таблица 38. За нито един от слюнчените показатели не се установява статистическа значимост на изследваните корелационни връзки. Единствено за UA се наблюдава тенденция за статистическа значимост на слабо изразената отрицателна корелационна връзка между нивата ѝ в слюнка и ендоскопските промени. Това наблюдение би могло отново да подчертае хипотезата, че в резултат на хроничното възпаление на стомашната лигавица и оксидативния стрес се намаляват нивата на UA в слюнка, като естествен неин антиоксидант.

Таблица 38. Корелационни взаимовръзки между степента на ендоскопските възпалителни промени в стомашната лигавица и изследваните параметри в слюнката при пациенти с НР(+) инфекция

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

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

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

Доказаните както повишено генериране на ROS, така и намален АОС при НР(+) гастрити корелират в умерена степен и статистически значимо, съответно положително и отрицателно, с ендоскопските промени в стомашната лигавица (таблица 39). Това е поредното доказателство за значението на оксидативния стрес като основен патофизиологичен механизъм при хроничното възпаление, обуславящ и степента на ендоскопските промените в стомашно-дуоденалната лигавица.

Таблица 39. Корелация между степента на ендоскопските възпалителни промени и серумните параметри за генериране на ROS и антиоксидантен капацитет при пациенти с НР(+) инфекция

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

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

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

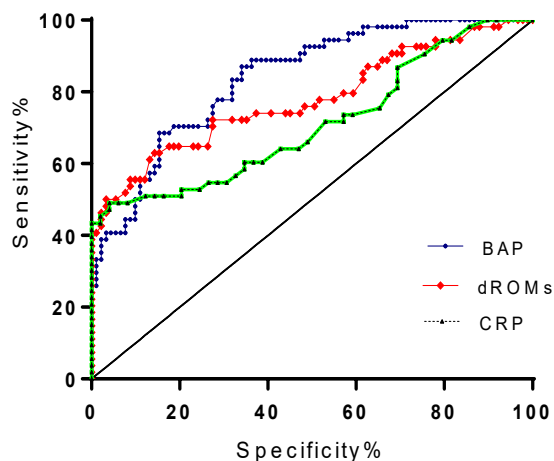
Във връзка с оценката на диагностичния потенциал на избраните серумни и слюнчени параметри и възможността им да разграничават болни (пациенти с хроничен гастрит) от здрави (контролна група) е осъществен ROC анализ, резултатите от който са посочени на таблица 40.

Таблица 40. Диагностичен потенциал на избрани серумни и слюнчени параметри

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

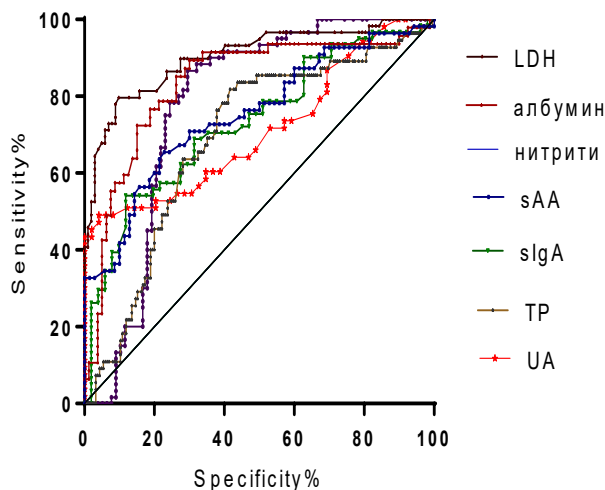
*Изследвани са пациентите с хронични гастрити спрямо контролната група здрави лица
AUC – площ под кривата; CI – доверителен интервал*

На фигура 33 са визуализирани данните от ROC анализа на серумните показатели. От изследваните серумни параметри се установява, че двата теста, свързани с оксидативния стрес, имат по-голяма площ под кривата (AUC) в сравнение с рутинно използвания в клинично-лабораторната дейност CRP, което потвърждава идеята, че тези два показателя са подходящи за мониториране на пациентите с хронични гастрити.



Фигура 33. ROC криви и AUC на серумни показатели за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица (Площта под кривата на съответните показатели са дадени в таблица 41)
dROMs – Реактивни кислородни метаболити; BAP- Биологичен антиоксидантен потенциал

На фигура 34 са визуализирани данните от ROC анализа на множество слюнчени показатели. Установява се, че няколко от тях (LDH и албумин) имат доста голяма площ под кривата (AUC: 0.903, 0.834), говорещо за много добра диагностична надеждност на тези показатели.

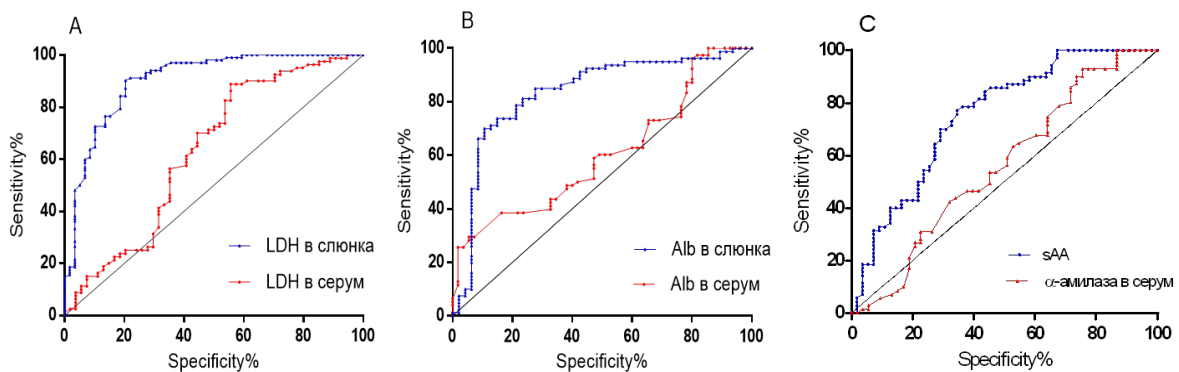


Фигура 34. ROC криви на избрани слюнчени биохимични параметри за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица (Площта под кривата на съответните показатели са дадени в таблица 41)
sAA- саливарна алфа-амилаза; sIgA- секреторен имуноглобулин А

Част от изследваните слюнчени показатели (нитрити, sIgA и sAA и белтък) имат сравнително голяма площ под ROC кривата (AUC: 0.775, 0.752, 0.731 и 0.689 съответно).

Тези показатели биха могли да имат важно диагностично значение, особено ако не се изследват самостоятелно, а заедно с някой от показателите от предходната група. Стойността на AUC за пикочна киселина е 0.560, което говори, че изследването ѝ в слюнка не е особено надежден показател при мониториране на пациентите с хронични гастрити.

За оценката на възможността слюнката да бъде използвана като неинвазивен и достъпен биологичен материал при разграничаване на болни (пациенти с хроничен гастрит) от здрави (контролна група) са сравнени ROC кривите на диагностичния потенциал на изследваните параметри в слюнка спрямо тези в серум. На фигура 35 (А, В, С) са визуализирани данните от ROC анализа за LDH, албумин, алфа-амилаза.



Фигура 35. ROC криви на слюнчените и серумни биохимични параметри LDH, албумин и алфа-амилаза за разграничаване на пациенти с хронични гастрити от контролната група здрави лица

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

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

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

белтък- 0.581 p=ns; площта под ROC кривата за слюнчената UA спрямо тази на серума са съответно 0.560 p=ns и 0.581 p=ns.

5.7. Заключение

Причиненият от НР хроничен гастрит, е най-често срещаната форма на гастрит, като инфекцията може да доведе до редица усложнения (кървене, язва или туморна метаплазия на мукозата). В този аспект нараства нуждата не само от навременна диагноза, но и от мониториране хода на това хронично-рецидивиращо заболяване, както и на ефикасността на лечението. Изследването на различни биохимични показатели и маркери в оралната течност би позволило да се избегнат неприятни и рискови за пациента инвазивни диагностични изследвания.

От изследваните подбрани биохимични показатели в слюнка се установява, че НР(+) инфекция оказва съществено влияние върху състава на слюнката. За разлика от тази инфекция, при НР(-) гастрити подобни промени в състава на слюнката не се наблюдават, като стойностите на параметрите в тази група са близки до тези от контролната група. Като етиологичен причинител, НР води до редица адаптивни механизми в гостоприемника, което се съпровожда с нарастване най-вече на тези биохимични показатели в слюнка, свързани с възпалителни и некротични тъканни промени (LDH, TP и ALB) или които осигуряват специфичната и неспецифична имунна защита на оралната мукоза (sIgA, нитрити). Обратно, за други параметри се установяват намалени стойности – например слюнчената UA, като основен антиоксидант, изчерпващ се в генерирания от възпалението оксидативен стрес, както и серумното желязо, необходимо както за макроорганизма, така и за микроорганизма. НР (+) инфекция се явява фактор променящ не само биохимичните показатели, но и клетъчния състав на слюнката, като най-засегнати са основните компоненти на лигавичната епителна бариера – епителни клетки и левкоцити. Установеният при НР инфекция оксидативен стрес, характеризиращ се с повишено генериране на ROS/RNS и намален плазмен антиоксидантен капацитет, е един от патогенетичните механизми, отговорни за стомашно-лигавичните увреди. Изследваните биохимични слюнчени и серумни маркери не се характеризират с много добра диагностична надеждност, когато са приложени самостоятелно, но използването им в констелация биха могли да са полезни за неинвазивна диагностика и мониториране на хроничните гастрити, както и за допълнително отдиференциране на НР(+) от НР(-) инфекция.

Не се доказва значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум, както при здравите лица, така и при пациенти с хронични заболявания на ГИТ

Слюнката като все още слабо позната биологична матрица е почти неизползвана в рутинната практика при диагностиката и мониторирането на редица хронични системни заболявания, включително и хроничните гастрити. Настоящото пилотно проучване доказва необходимостта от още проучвания, обхващащи голям брой индивиди, за да се разкрие напълно диагностичния потенциал на слюнката като допълнителна матрица или алтернатива на серума при различни хронични възпалителни заболявания.

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

Хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) се отнасят към група идиопатични заболявания на червата, които се характеризират с хронично-рецидивиращ ход. Двата най-често срещани вида ХВЧЗ са улцерозен колит (УК), засягащ обикновено дебелото черво, и болестта на Крон (БК), която може да включи всички сегменти на стомашно-чревния тракт (от уста до анус). Както УК, така и БК са имуно-медиирани заболявания с мултифакторна патогенеза, състояща се от сложни взаимовръзки между нарушени имунни отговори, генетично предразположение, рискови фактори на околната среда и дефекти на епителната бариера. ХВЧЗ засягат главно млади хора в активна възраст. Обострянето на заболяването възниква предимно непредсказуемо, а постоянната инфламаторна активност се отразява негативно на физическото и психическото благосъстояние на пациента, водещо до понижена работоспособност и социалната изолация (Liverani et al., 2016). Фазите на обостряне са с различна продължителност и интензивност и могат да доведат до тежки усложнения – фисури и абсцеси, мегаколон, полипоза, чревни перфорации и др. (Ahluwalia et al., 2018).

За да се изпълнят задачите по настоящия раздел, са подбрани 54 лица с доказано хронично чревно-възпалително заболяване на средна възраст 43.9 ± 14.7 години, които отговарят на критериите за включване в изследването и не покриват тези за изключване от проучването (т. 1. Изследвани лица). От здравите доброволци, участвали в проучването, са подбрани 80 индивида на средна възраст 43.1 ± 10.8 години, съответстваща на тази на пациентската група ($p > 0.05$).

6.1. Характеристика на пациентите с ХВЧЗ

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

Обобщени демографски данни и данни за клиничната активност (обостряне или ремисия) при пациентите с ХВЧЗ са представени на таблици 41, а видът терапевтичен режим – на таблица 42.

Таблица 41. Демографски и клинични характеристики на пациентите с ХВЧЗ

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

Таблица 42. Вид терапевтичен режим при пациенти с ХВЧЗ

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

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

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

Устната кухина, като свързана морфо-функционално и филогенетично с гастро-интестиналния тракт, реагира с промени при много заболявания, засягащи ГИТ. От друга страна тя се явява входна врата за проникване на различни инфекции, повлияващи общото здраве. Няколко проучвания установяват, че пациенти с БК имат влошен орален статус спрямо здравите и по-голяма необходимост от дентално лечение. Освен това при активно протичащите форми на ХВЧЗ се наблюдава по-голям брой орални проблеми, което може да се дължи на дисфункция на слюнчените жлези (de Vries et al., 2018, Johannsen et al., 2015). Редица изследователи съобщават, че слюнката на пациенти с ХВЧЗ се различава по състав (повишени нива на много възпалителни цитокини, имуноглобулин А, относително изобилие на някои бактериални видове и по-ниско ниво на лизозим) и има различни имунологични свойства (Said et al., 2014). Изследването на оралната течност придобива все по-голямо значение, като възможност да се избегнат

неприятни и рискови изследвания, каквито са ендоскопските изследвания с вземане на биопсичен материал при проследяване хода на ХВЧЗ в релапс и ремисия.

На включените в проучването индивиди, формиращи пациентската и контролна групи, са изследвани подобрани показатели в слюнка и серум, свързани с възпалението, оксидативния стрес и имунологичните механизми на защита, представени съответно на таблици 43 и 44.

Таблица 43. Изследвани слюнчени параметри при пациенти с ХВЧЗ в сравнение с контролната група

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

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

Таблица 44. Изследвани серумни параметри при пациенти с ХВЧЗ в сравнение с контролната група

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

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

Обсъждане на резултатите

Ксеростомията (субективното усещане за сухота в устата) и хипосаливацията (обективно намаляване на скоростта на слюнчен поток) са често срещани при пациенти с ХВЧЗ, дължащи се не само на дехидратацията в следствие на диаричния синдром, но и на непрекъснато прилаганите медикаменти като 5-aminosalicylic acid (5-ASA) и имunosупресори. Тези състояния водят до промени в биохимичния състав на слюнката (Eveson, 2008).

Счита се, че пикочната киселина като антиоксидант е отговорна в най-голяма степен за неутрализирането на ROS в слюнка (Bakhtiar et al., 2017). В настоящето проучване се наблюдава статистически значимо снижени стойности на слюнчената UA при пациентите в активна форма на заболяването спрямо тези в ремисия или лека форма (p=0.029) и спрямо контролната група (p<0.0001). Такава разлика липсва между пациентите в ремисия или лека форма и контролната група (p=0.865). Добре известно е, че оксидативният стрес играе съществена роля в патогенезата и прогресирането на ХВЧЗ

(Tian T. et al., 2017), а резултатите от нашето проучване навеждат на мисълта, че оксидативният взрив е значимо по-голям при пациентите с активна форма на заболяването, което от своя страна води и до съответно понижаване на основния антиоксидант в слюнката, а именно UA. Средната стойност на слюнчената UA в тази група попада в долния диапазон на определените от нас референтни граници, като една пета от тях са със стойности под долна референтна граница. В литературата данните за слюнчената UA и значението ѝ за ХВЧЗ са твърде ограничени. Обикновено този слюнчен антиоксидант се изследва при локални възпалителни заболявания и значително по-рядко при системни заболявания, включително и тези, които засягат ГИТ. Rezaie и сътр. (2006), изследвайки промените в слюнката, свързани с ОС и АОС, установяват също, че при пациентите с БК стойностите на UA и други антиоксиданти като албумин, трансферин и тиолови молекули са значимо по-ниски в сравнение с тези на контролната им група, но не успяват да докажат корелация с тежестта на заболяването (CDAI). Вероятно поради малкия брой изследвани лица, те установяват корелация единствено за тоталния антиоксидантен капацитет на слюнката.

В научната литература се намират редица данни относно повишени серумни нива на UA при ХВЧЗ. Така например Tian S. и сътр. (2018), изследвайки пациенти с улцерозен колит установяват статистическо значимо повишение на UA, но не установяват взаимовръзка между стойностите ѝ и клиничния стадий. Други изследователи, използвайки съотношението UA/креатинин откриват значимо по-високи нива, както и слаба към умерена корелационна зависимост с индекса на активност (CDAI) при БК (Zhu et al., 2018). Освен това те докладват за положителна взаимовръзка между повишените серумни нива на UA и титъра на антитела срещу *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), един от двата най-полезни биомаркери за ХВЧЗ. Резултатите от настоящото проучване показват статистически значимо по-високи серумни нива на UA в пациентската група с активна форма на заболяването спрямо тези с ремисия/лека форма ($p=0.014$), както и с контролните индивиди ($p=0.0003$). Въпреки това стойностите остават в референтните граници. Интересно е, че серумните нива на UA при пациентите от втората подгрупа не се различават значимо от тези в контролната група ($p=0.093$). Здравите хора отделят UA по два основни начина: 70% се екскретират през бъбреците, а останалите 30% – чрез червата. Екскрецията на UA се регулира главно от няколко вида UA транспортери, като основният е АТР-свързващ транспортер от подсемейство G (ABCG2). Той се експресира не само в проксималното бъбречно каналче, но и в чревната

мембрана. Deuring и сътр. (2011) установяват, че експресията на протеин ABCG2 е понижена при пациенти с ХВЧЗ по време на активния стадий на заболяването, което намалява екскрецията на UA. От друга страна колонизацията на чревния тракт с *S. cerevisiae* засилва метаболизма на пурины в гостоприемника и води до увеличено производството на UA, която във високи концентрации локално действа и прооксидантно и влияе негативно върху хода на възпалението на чревната мукоза (Chiario et al., 2017). *Въпреки че, UA както в слюнка, така и в серум има потенциала да дискриминира пациентите в активност от тези в ремисия, тя не би могло да се използва самостоятелно за тази цел, поради факта че голям процент от случаите попадат в границите на референтния интервал.*

Слюнчените жлези синтезират около 83% от белтъците, намиращи се в оралната течност (ензими, муцини, цистатини и др.). В научната литературата данните относно нивата на слюнчения TP при ХВЧЗ са твърде оскъдни. Така например Said и сътр. (2014), изследвайки саливарната микробиота при пациенти с БК и УК, докладват, че няма значима разлика в концентрацията на общия протеин в слюнката при изследваната пациентска и контролна група, докато Hasan и сътр. (2012), обратно, откриват значимо по-високи стойности на слюнчения белтък. Резултатите от нашето проучване са в съгласие с тези на последния екип. Макар и средната стойност на TP в слюнка от пациенти с тежка форма на заболяването да попада в горно-граничната област на определения от нас референтен интервал, се установяват статистически значимо по-високи стойности в сравнение с тези в лека форма или ремисия ($p=0.047$), както и спрямо индивидите от контролната група ($p<0.001$). Нивата на TP в групата в ремисия или лека форма на заболяването не се различават съществено от тези в контролната група. Очевидно е, че при пациентите с активна форма на заболяването тежката клинична картина, съпроводена с дехидратация, диселектролитемия и хипопротеинемия води до намален слюнчен поток, обуславящ по-високите нива на тоталния протеин в слюнката. Докато липсващата или лека симптоматика при втората подгрупа пациенти не води до съществени различия в нивата на слюнчения белтък. *Така може да се заключи, че слюнченият TP е подходящ и неинвазивен биомаркер, удобен за проследяване активността на заболяването, но попадайки в границите на референтния интервал не трябва да се използва самостоятелно.*

За разлика от слюнчените нива на TP, серумните не се явяват добър дискриминатор за активност на заболяването – липсва статистически значима разлика в серумните нива

между двете пациентски подгрупи ($p=0.805$). Независимо от степента на активност и в двете пациентски подгрупи средните стойности на TP се различават статистически значимо от контролната група ($p<0.0001$) и са на долна референтна граница, като при почти половината от тях (26 пациента) нивата попадат в патологично ниския диапазон. *С други думи хипопротеинемията, дължаща се на безапетитието и нарушеното храносмилане и абсорбция в чревния тракт, е характерна за налично ХВЧЗ, но трудно би могла самостоятелно да категоризира степените на активност на заболяването.*

Макар и в изключително ниски концентрации, албуминът в слюнката има съществени функции. При системно неопластично заболяване (напр. карцином на гърдата) са установени по-високи стойности на слюнчения албумин, в резултат на повишена пропускливост на базалната мембрана или вариации във филтрацията на албумина през капилярите на слюнчените жлези (Al-Muhtaseb, 2014). Изключително малко и противоречиви са данните в литературата за саливарния албумин и промените му при ХВЧЗ. Така например Hasan и сътр. (2012) докладват за незначимо покачване на саливарния ALB в група лица с цьолиакия, докато Rezaie и сътр. (2006) установяват статистически значимо по-ниски стойности при пациенти с активна форма на БК. В настоящото проучване резултатите за слюнчения ALB са сходни с тези за общия белтък в слюнка – статистически значимо по-високи стойности при пациентите с активна форма в сравнение с тези при пациентите с лека форма ($p=0.031$) и при контролната група ($p=0.004$) и липса на значима разлика между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди ($p=0.833$). Вероятно промяната се дължи както на дехидратацията и намаления слюнчен поток, така и на повишена пропускливост на базалната мембрана на слюнчените жлези, по-изразени в активната фаза на болестта. Въпреки статистическите различия с контролната група, стойностите на слюнчения ALB в двете пациентски групи попадат изцяло в референтният диапазон. *Така както и слюнченият TP, и слюнченият ALB се явява подходящ и неинвазивен биомаркер за мониториране хода и активността на хроничното чревно възпаление, но не би трябвало да се използва като самостоятелен лабораторен параметър.*

И резултатите за серумните нива на албумин повтарят тези на серумния общ белтък – установяват се статистически значимо по-ниски стойности и за двете пациентски подгрупи спрямо контролната група ($p<0.0001$), но липсва различие между тях самите ($p=0.694$). Освен нарушеното хранене и малабсорбция, но и хроничният възпалителен процес, водещ до намален синтез в черен дроб на албумин (като негативен острофазов

белтък) и до повишен катаболизъм спомагат за хипоалбуминемията при ХВЧЗ. Освен това албуминът се причислява към т.нар. неензимни протеинови антиоксиданти и редица автори намират също спад в концентрациите му при ХВЧЗ, независимо от вида и активността на заболяването (Yuksel et al., 2017; Su Q et al., 2019). Ниската серумна концентрация на албумин е един от индикаторите за недोхранване и намалените му стойности при пациенти с ХВЧЗ, особено в активната фаза на заболяването (Bourgonje et al., 2019). Khan и сътр. (2017) установяват, че нива на серумен албумин ≤ 35 g/L при ново диагностицирани пациенти с УК е лош прогностичен показател, а също са и предиктивни за неуспех на лечението и настъпване на ранни усложнения (колектомия). Освен това Thara и сътр. (2016) смятат, че изразената хипоалбуминемия в хода на заболяването е свързано с тиопуринова недостатъчност и липса на отговор на анти-TNF терапия при пациенти с УК. Интересни наблюдения правят Su и сътр. (2019), които намират ниски серумни нива на албумин, пикочна киселина и билирубин (като серумни антиоксиданти) при пациенти с БК, като те се намират в обратна връзка със степента на прогресия на заболяването. В нашето проучване 16 пациента (30%) общо за двете пациентски групи са със стойности под референтните граници за албумин в серум. *За разлика обаче от слюнчения ALB, серумните му стойности трудно биха могли да бъдат дискриминиращ фактор за различните степени на активност на заболяването, подобно на TP в серум.*

Слюнката съдържа различни компоненти като цитокини, имуноглобулини и антимикробни протеини, участващи в редица защитни механизми на гостоприемника за поддържане на оралното и системно здраве. Иммунната система играе важна роля за развитието и прогресията на ХВЧЗ. Описана е връзка между ниския sIgA и по-висок риск от автоимунни заболявания, такива като болест на Крон, цьолиакия, системен лупус еритематодес, туморни процеси и др. (Phillips et al., 2015; Ahmadiafshar et al., 2015). Открити са и намален брой на В-лимфоцитите, продуциращи IgA и увеличен брой на В-лимфоцитите, продуциращи IgG при стомашно-чревни възпалителни заболявания (Brandtzaeg, 2010). Секреторният IgA не само зависи от антигенната стимулация, но също така е под силен невроендокринен контрол. Редица фактори като стрес, емоционални и физически натоварвания, могат да се окажат възможни инициатори за поява на ХВЧЗ и/или за активиране на възпалението с повлияване нивата на sIgA (Gillum et al., 2014). Интересни са проучванията на Said и сътр. (2014) и Savage и сътр. (2004), които намират по-високи стойности на sIgA при пациенти с ХВЧЗ, само ако са придружени с орални екстраинтестинални прояви, но не откриват повишени стойности на sIgA при пациентите

с ХВЧЗ без симптоми от страна на устната кухина. За разлика от тези изследвания, резултатите от настоящото проучване показват значимо намаляване на стойностите на sIgA при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение със стойностите му както при пациенти с лека форма на ХВЧЗ ($p=0.003$), така и при контролната група ($p<0.0001$), докато статистическо различие между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди липсва. Важно е, да се спомене, че 50 % от болните в активност на заболяването имат стойности под долна референтна граница. Може да се предположи, че тези по-ниски нива на sIgA са свързвани с активността на заболяването и отразяват намаления имунен отговор в лигавиците, хроничната възпалителна реакция, увеличения оксидативен стрес и дисбактериоза във фазата на активност (Phillips et al., 2015). *Имайки предвид, че за разлика от слюнчените UA, TP и ALB, слюнчените нива на sIgA излизат извън референтния ни интервал за голяма част от болните с активност на заболяването, информативната му стойност като самостоятелен параметър, разграничаващ добре пациенти с активност от тези в ремисия нараства.*

Серумните концентрации на IgA при ХВЧЗ пациенти както с активна, така и с лека форма на заболяването или в ремисия са статистически значимо по-високи спрямо контролната група (съответно $p=0.032$ и $p=0.048$), но не се различават помежду си ($p=0.873$). Повишените нива на IgA вероятно се обясняват с имунологична пренастройка на макроорганизма. Така например няколко проучвания показват, че имунната система при ХВЧЗ реагира срещу много от микроорганизмите, съставляващи нормалната микрофлора на червата с образуване на специфични антитела ASCA и pANCA от клас IgA и IgG (Kuna, 2013; Mitsuyama et al., 2016). Нашите данни са в съгласие с изследванията на Ahmed и сътр. (2020), които установяват при пациентите с УК и БК значително повишени концентрации на IgG и IgA в сравнение със здрави контроли. Engstrom и сътр. (1978) също откриват значимо по-високи нива на серумните IgA и C3 при лица с ХВЧЗ. Хроничният възпалителен процес води до промяна в серумните нива на IgA, но те остават в границите на референтния интервал. Като се вземе предвид и факта, че за този показател липсва статистическо различие между двете пациентски групи, трудно би могло той да се използва за мониториране на активността на заболяването, за разлика от слюнчения sIgA. *Спрямо циркулиращите серумни нива на IgA, намаляващите стойности на sIgA имат по-съществено значение при имунните нарушения в ГИТ.*

Хроничният възпалителен процес играе роля за инфилтриране на оралната мукоза с левкоцити и засилено излющване на епителни клетки, което обуславя увеличаване им брой в оралната течност. Достига се и до по-висока активност на ензима LDH, свързана с некрозата на тези клетки. В научната литературата се срещат основно данни за повишаване активността на ензима при локално засягане на устна кухина (пародонтоза, сквамозелуларен орален карциноми и др.), докато за слюнчената LDH при системни заболявания, включително и ХВЧЗ, данните са ограничени. В настоящото проучване се наблюдават най-високи стойности на ензима в пациентската група с активна форма на заболяването, статистически значимо различни спрямо тези на контролната група ($p < 0.0001$), както и спрямо тези на пациентите с лека форма на заболяването или в ремисия ($p < 0.0001$). От своя страна, последните не се различават значимо от тези на контролната група ($p = 0.655$). Прави впечатление, че за разлика от другите две групи средната стойност на слюнчените нива на ензима в групата с активност на заболяването е в горно-граничната област на определените в нашето проучване референтни граници, като при 23 % от пациентите нивата са извън референтния интервал. *Подобно на sIgA слюнчената LDH е добър дискриминатор между пациенти с тежка форма на заболяването от тези с лека форма или ремисия.*

Що се касае до серумните концентрации на LDH при ХВЧЗ, в литературата има данни за повишените им нива. Така напр. Conrad и сътр. (2002) и El-Kareem и сътр. (2006) установяват, че както ензимът LDH, така и СУЕ и CRP са значимо повишени като израз на неспецифичен отговор спрямо имуно-медираното възпаление при УК. Резултатите от настоящото проучване са в съгласие с тези от литературата, като нивата на серумната LDH при пациентите както с активна, така и с лека форма на заболяването или в ремисия са статистически значимо по-високи спрямо тези на контролната група (съответно $p = 0.0001$ и $p = 0.002$), но не се различават помежду си ($p = 0.873$). Въпреки това те са все още в референтни граници. Може да се заключи, че *серумните нива на LDH са по-малко информативни по отношение мониториране активността на заболяването в сравнение със слюнчените нива на ензима.*

Слюнчената алфа-амилаза (sAA) представлява 40-50% от общия белтък, произведен от слюнчените жлези. Това е поредният слюнчен показател в настоящето проучване, който търпи статистическо значимо повишение при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение с пациентите с лека форма или в ремисия ($p = 0.048$), както и в сравнение с контролната група ($p = 0.012$). Отново не се установява

статистическа значима разлика в стойностите на sAA в последните две групи ($p=0.985$). Съществено е да се отбележи, че това е единственият слюнчен показател, чиято средна стойност за групата с висока активност на заболяването попада извън определените от нас референтни граници в нестимулирана слюнка. Въпреки широките граници на вариации в активността на този ензим, за 33% от пациентите в тази група са установени патологично повишени стойности. Може да се предположи, че слюнчените жлези увеличават секрецията на sAA по време на възпаление, за да защитят устната кухина. Стресът и болката, които придружават обострянето на заболяването, намаляват скоростта на слюнчения поток и увеличават секрецията на ензима. Активирането на симпатиковата нервна система играе важна роля в медирането на чревното възпаление, като се смята, че тя има провъзпалителни свойства, докато парасимпатиковата нервна система притежава противовъзпалителни свойства (Straub et al., 2006). Ху Z. и съавт. (2018) откриват значително по-голяма честота на тревожност и депресия при пациенти с ХВЧЗ със значимо повишени базални и стимулирани нива на sAA спрямо контролите, като маркер на психологически стрес. *Резултатите относно sAA дават основание и този слюнчен показател да се използва като полезен биомаркер, с помощта на който може да се мониторира хода и активността на ХВЧЗ.*

В настоящето проучване серумните стойности на ензима алфа-амилаза са в референтни граници и при трите изследвани групи, като не се установява различие между тях. Само трима пациента са с повишени стойности на серумната амилаза, без това да е съпроводено с клинична симптоматика за панкреатит. В литературата има описани казуси на хиперамилаземия при пациенти с БК със субклинично засягане на панкреаса. Така например Vokemeuer (2002) установява при 14% от 136 пациента с ХВЧЗ асимптомно повишаване на серумната амилаза без наличен панкреатит. *В сравнение със sAA, серумната алфа-амилаза не е подходящ показател за мониториране на чистите форми на ХВЧЗ, непридружени с панкреатит.*

Във физиологични концентрации азотният оксид (NO) е важна молекула, участваща в защитата и хомеостазата на гостоприемника като модулира възпалителния отговор. В патологично повишени концентрации играе важна роля за прогресирането на хроничните възпалителни заболявания, включително и тези на червата. NO е важен етиологичен фактор, водещ до вазодилатация в лигавицата, повишена васкуларна и епителна пропускливост и повишен мотилитет на червата, с което допринася за развитието и поддържането на хроничното възпаление при ХВЧЗ (Avdagić et al., 2013;

Nunes et al., 2015). Макар че слюнчените жлези вземат активно участие в екзогенния път за синтез на NO, при ХВЧЗ превес има ендогенният път за сметка на по-голямата експресия на ензима iNOS и генериране на RNS, които влошават възпалителния процес. iNOS стимулира производството на TNF- α в лигавицата на средната и дисталната част на дебелото черво, с което потенцира инфилтрацията на имунни клетки и генерирането на високи нива RNS (Dijkstra et al., 1998). Така при активност на заболяването се очаква концентрацията на нитритите да е висока. В хистологични препарати от биопсии на дебело черво на пациенти с УК се установява трикратно повишена активност на iNOS а при пациенти с БК – петкратно повишение на ензимната активност (Guihot et al., 2000). Многобройни експериментални проучванията показват повишени нива на нитритите при релапс, не само в серума, но и в изпражненията и урината (Ljung et al., 2006; Avdagić et al., 2013). Резултатите от настоящото проучване показват статистически значимо увеличени стойности на нитритите в слюнката при пациенти с активна форма на ХВЧЗ в сравнение с тези с лека форма или в ремисия ($p=0.042$), както и в сравнение с контролната група ($p=0.019$). Още повече, че средната стойност на слюнчените нитрити при пациентите с активна форма са горно гранични, като приблизително една трета от тях са извън определените от нас референтни граници. Интересно е, че липсва значима разлика между втората пациентска подгрупа и контролните индивиди ($p=0.884$). Вероятно стихването на възпалителния процес на чревната лигавица води до уеднаквяване нивата на слюнчените нитрити при тази пациентска група спрямо контролната група. *Установеното в настоящото проучване статистически значимо различие в нивата на слюнчените нитрити между двете пациентски групи дава основание и този слюнчен показател да се предложи като полезен и достъпен биомаркер за мониториране активността на заболяването.* В подкрепа на нашите резултати са и множество данни от научната литературата. Jahanshahi и сътр. (2004), изследвайки пациенти с ХВЧЗ, установяват високи стойности на NO в слюнката както при пациенти с БК, така и при пациенти с УК. Данните ни съответстват и на докладваните от Rezaie и сътр. (2007) значимо по-високи слюнчени нива на нитрити при пациентите с БК спрямо здрави контроли. Високите нива на ROS/RNS са важен патогенетичен механизъм в поддържане на възпалението, водещо до увреждане на цитоскелета на чревните клетки, нарушение на бариерната им функция и повишена пропускливост. Тлеещата възпалителната реакция в чревната лигавица се придружава от загуба на чревните бокални клетки, хиперплазия на криптите, намалено производство на мукус и улцеративни промени. В научната литература се срещат публикации, в които е

установено повишено съдържание NO както в аспирират от дебелочревно съдържимо, така и в издишания въздух при пациенти с ХВЧЗ (Koeck et al., 2002; Ikonomi et al., 2016), което е в подкрепа на значението на ендогенния път за синтез на NO и засиления му ентеросаливарен кръговрат.

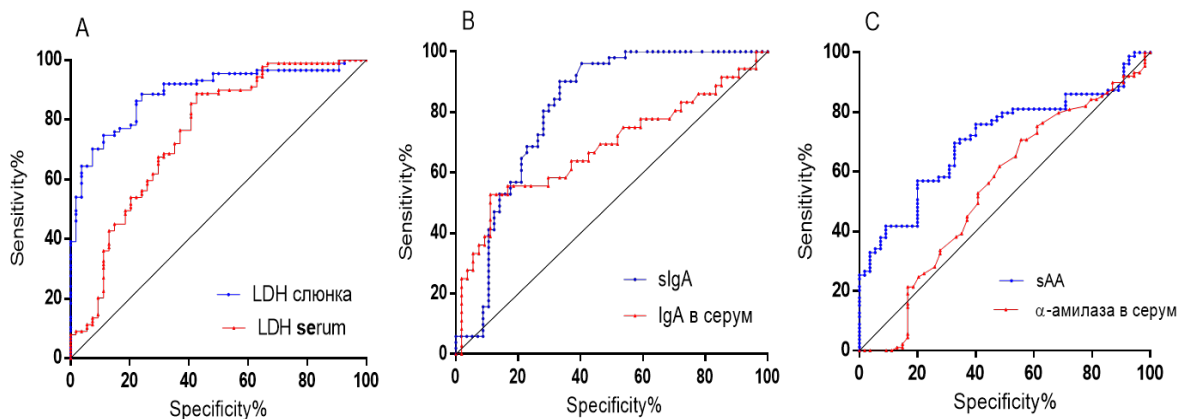
За да се прецени диагностичния потенциал на изследваните слюнчени показатели е проведен ROC анализ, данните от който са представени на таблица 45.

Таблица 45. Диагностичен потенциал на избрани слюнчени параметри при пациенти с ХВЧЗ

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

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

От всички изследвани слюнчени параметри с най-голяма площ под кривата се характеризират LDH и sIgA, говорещо за много добър диагностичен потенциал на тези слюнчени показатели. Показателите sAA и албумин се представят с една междинна стойност на AUC, а нитрити, UA и TP – с най-ниски стойности. За параметрите, които имат най-голяма стойност на AUC е осъществен допълнителен сравнителен ROC анализ (слюнка/серум), за да се прецени дали те са по-надеждни от съответните серумни показатели и възможността слюнката да бъде използвана като неинвазивен и достъпен биологичен материал при разграничаване на болни (пациенти с ХВЧЗ) от здрави индивиди (контролна група). Резултатите от този анализ са визуализирани на фигура 36 А, В, С.

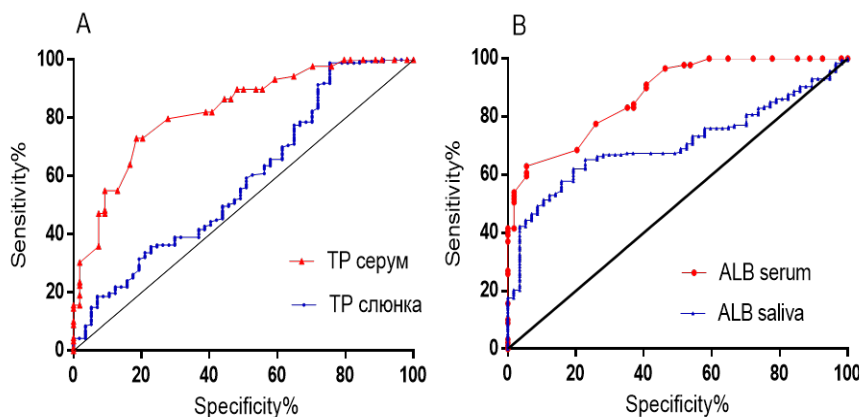


Фигура 36. ROC криви на LDH, sIgA и sAA в слюнка в сравнение с ROC кривите на LDH, IgA и алфа-амилаза в серум при пациенти с ХВЧЗ

- A. Площ под ROC кривите за LDH (AUC за слюнка 0.899, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.755, $p = 0.001$)
 B. Площ под ROC кривите за sIgA (AUC за слюнка 0.810, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.651, $p = 0.04$)
 C. Площ под ROC кривите за sAA (AUC за слюнка 0.701, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.543, $p > 0.05$)

На фигура 36 ясно се вижда, че посочените слюнчени параметри (LDH, sIgA и sAA) имат по-голяма площ под кривата в сравнение със съответните серумни показатели, с което се потвърждава по-добрият им диагностичен потенциал.

За разлика от тях, слюнчените TP и ALB показват по-малка площ под кривата, съответно по-слаб диагностичен потенциал в сравнение със серумните TP и ALB, рутинно използвани в клиничната практика относно диагностиката и проследяването на тежестта на ХВЧЗ (фиг. 37 А и В).



Фигура 37. ROC криви на TP и ALB в слюнка в сравнение с ROC кривите на TP и ALB в серум при пациенти с ХВЧЗ

- A. Площ под ROC кривите за TP (AUC за слюнка 0.587, $p = 0.05$ срещу AUC за серум 0.825, $p < 0.0001$)
 B. Площ под ROC кривите за ALB (AUC за слюнка 0.706, $p < 0.0001$ срещу AUC за серум 0.890, $p < 0.0001$)

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

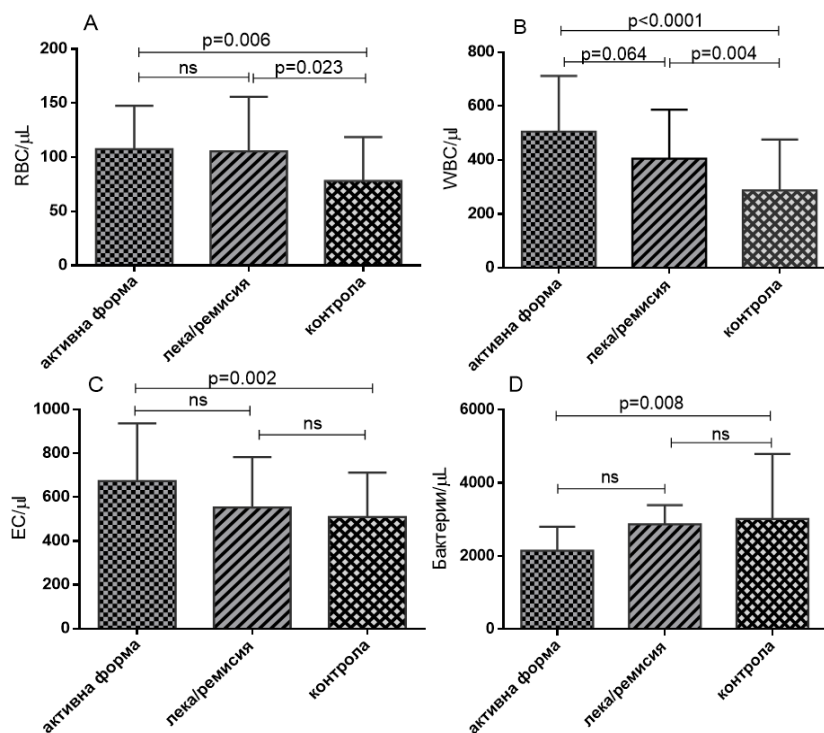
Като имуномедиирани заболявания БК и УК ангажират не само чревната лигавица, но могат да имат и извънintestinalни прояви в устната кухина и други органи (стави, кожа, очи, жлъчни пътища). Оралните лезии, като клинична проява, са описани за първи път през 1969 г. от Dudeneу. Честотата им варира от 5% до 30%, като най-често се наблюдават при болестта на Крон под формата на хейлит, улцерации, фисури и глосит (Padmavathi et al., 2014, Lankarani et al., 2013). Устните прояви в 5% до 10% от случаите могат да бъдат първият признак на заболяването и дори да предшестват появата на чревни лезии (Plauth et al., 1991). Някои от оралните промени се считат за специфични за заболяването (грануломатозни промени, подобни на тези в червата), а други за неспецифични, дължащи се на афтозен стоматит, пиостоматит или на лекарствени ефекти, недохранване, придържане към специфични диети, анемия, диселектролитемия и хиповитаминоза. Тези находки в устната кухина могат да спомогнат за диагностициране и наблюдение на активността на процеса при ХВЧЗ (Danese et al., 2005; Muhvić-Urek et al., 2016).

За да се разкрие отражението на хроничния възпалителен чревен процес върху промените в устната кухина, в настоящото проучване се изследва и слюнченият клетъчен състав на нестимулирана слюнка. Данните за отделните видове клетки са представени в таблица 46, а сравнението между отделните групи – на фигура 38 А,В,С и D.

Таблица 46. Клетъчни елементи в нестимулирана слюнка в трите изследвани групи

Параметри [cells/ μ L] Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean \pm SD)	Лека форма/ремисия (mean \pm SD)	Контролна група (mean \pm SD)	p value
RBC (14.0÷156.0)	107.4 \pm 40.4	105.6 \pm 50.4	78.1 \pm 40.7	<0.0001
WBC (58÷451.0)	505.4 \pm 207.0	405.9 \pm 108.7	287.8 \pm 188.7	<0.0001
EC (104 ÷698)	673.4 \pm 264.8	552.8 \pm 230.8	509.0 \pm 207.0	0.0004
Bacteria (1810÷5115)	2146 \pm 659.7	2872 \pm 518.9	3018 \pm 1774	0.012

Различията в броя на клетъчните елементи в трите изследвани групи са оценени с помощта на One way ANOVA



Фигура 38. Сравнение на слюнчените клетъчни елементи в трите изследвани групи

A) Еритроцити, B) Левкоцити, C) Епителни клетки и D) Бактерии
(Приложен е One way ANOVA с корекция на Bonferroni)

Обсъждане на резултатите

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

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

Устната кухина е покрита от многослоен плоскоклетъчен епител с висок регенераторен капацитет, който се явява бариера срещу механично химично увреждане, както и срещу патогенна микрофлора. Като част от лигавичната бариера, ЕС са метаболитно активни и могат да реагират на външни агенти чрез синтез на различни цитокини и адхезионни молекули и матрични металопротеази (Groeger and Meyle, 2019). В настоящото проучване се установява увеличен брой на ЕС в пациентската група с активна форма на заболяването, който се различава значимо спрямо контролната група ($p=0.002$), но не и спрямо групата с лека форма или ремисия. Прави впечатление, че средните стойности за ЕС в първата група са в горно граничния диапазон на определените от нас референтни граници и приблизително 52% от пациентите имат брой, надвишаващ горната референтна граница. Вероятно хроничното възпаление и ксеростомията, особено през периода на релапс водят да повишена десквамация на букални епителни клетки. По време на възпаление настъпва и миграция на различни бели кръвни клетки. В настоящото проучване се установява статистически значимо по-висок брой на WBC в пациентската група с активна форма на ХВЧЗ и контролната група ($p<0.0001$). Подобно различие се установява и между пациентската група с лека степен/ремисия на заболяването спрямо контролата ($p=0.043$). Наблюдава се тенденция за различие в броя на WBC между двете пациентски групи ($p=0.064$). Трябва да се отбележи още, че средният брой на WBC в пациентската група с активна форма е извън определения от нас референтния интервал (505.4 ± 207.0 при РГ $58\div 451.0/\mu\text{L}$). *По тази причина може да се заключи, че би могло да се проследява броят на левкоцитите в слюнка при мониторирането на чревното възпаление и проследяване активността на заболяването.*

Левкоцитозата с неутрофилия и завишените стойности на CRP е едно нормално явление на общата възпалителна реакция на организма, макар и неспецифична за ХВЧЗ. Като се има предвид хроничния ход на заболяването и особености в индивидуалния отговор, стойностите на съответните възпалителни показатели не винаги са увеличени и/или съответстват на тежестта му. Освен това кортикостероидната терапия, включвана в периодите на релапс, вероятно влияе върху съдържанието на клетъчните елементи в оралната течност, чрез промяна пропускливостта и миграцията на еритроцитите и левкоцитите през гингивалните цепки. Това вероятно са и причините, поради които не откриваме корелационна зависимост между общия брой на циркулиращите WBC и CRP с броя на слюнчените левкоцити.

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

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

Стомашно-чревният тракт е основно място за генериране на ROS, където имунните клетки на гостоприемника поддържат имунен толеранс към коменсалните микроорганизми и хранителните антигени. Проучванията показват, че при продължителното чревно възпаление се генерират необичайно високи нива на реактивни кислородни и азотни видове (ROS/RNS), предизвикващи белтъчна модификация и ензимна дисфункция, ДНК лезии и нарушена митохондриална биоенергетика и апоптоза, както и увеличена експресия на гени, участващи във вродени и адаптивни имунни

отговори в ГИТ (Chen and Gibson, 2008; Alzoghaibi, 2013; Guan and Lan, 2018). Чревните клетки притежават различни антиоксидантни системи за да се противопоставят на генерираните ROS/RNS като най-ефективни са вътреклетъчните ензими супероксид дисмутаза (SODs), глутатион пероксидаза (GPX) и каталаза (CAT), както и неензимния антиоксидант глутатион. Групата на извънклетъчните антиоксиданти (наречени още „чистачи“ на ROS), включват витамини, минерали, церулоплазмин и пикочна киселина (Dudzińska et al., 2018). Хроничното възпаление и хиперактивността на имунната система води до съответно пропорционално намаление на антиоксидантния капацитет (АОС), с което се създават условия за дисбаланс между оксиданти и антиоксиданти и възникване на оксидативен стрес.

За по-пълно изясняване на патофизиологичните механизми, развиващи се в хода на възпалителния процес при ХВЧЗ, в настоящето проучване са изследвани dROMs, SAT и BAP тестове в слюнка и серум, които служат като показатели, оценяващи генерирането на ROS и общия АОС. Резултатите от извършените изследвания са посочени в таблици 47 и 48, като установените различия между показателите в трите проучвани групи са илюстрирани на фигури 39А,В и 40 А,В.

Таблица 47. Нива на ROS и АОС в слюнка в трите изследвани групи

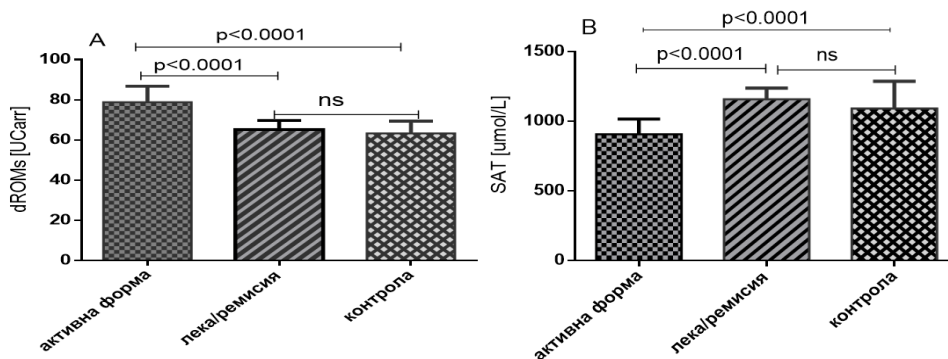
Показател (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
*dROMs [Ucarr] (58÷70)	78.9±7.9	65.4±4.5	63.3±6.1	<0.0001
**SAT [µmol/L] (924.5÷1571)	906±109.5	1158±79.5	1091±195.6	<0.0001

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA (*dROMS – тест за определяне на ROS; **SAT – тест АОС)

Таблица 48. Нива на ROS и АОС в серум в трите изследвани групи

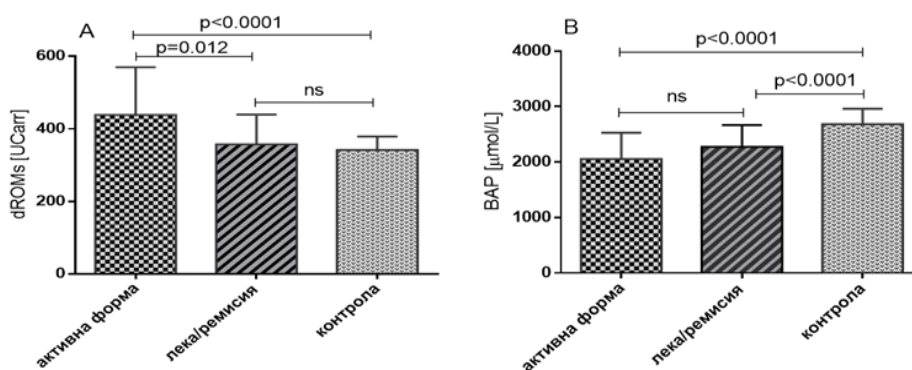
Показател (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
*dROMs [Ucarr] (252.4÷463.5)	437.8±131.4	357.0±81.7	341.2±37.48	<0.0001
**BAP [µmol/L] (2210÷3400)	2047±608.9	2206±432.8	2683±279.9	<0.0001

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA (*dROMS – тест за определяне на ROS; **BAP – тест АОС)



Фигура 39. Сравнение на нивата на генерираните ROS (A) и AOC (B) в слюнка в трите изследвани групи.

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni (*dROMS – тест за определяне на ROS; **SAT – тест AOC)



Фигура 40. Сравнение на нивата на генерираните ROS (A) и AOC (B) в серум в трите изследвани групи.

Сравнителният анализ на различията между трите изследвани групи е осъществен с One way ANOVA с корекция на Bonferroni (*dROMS – тест за определяне на ROS; **BAP – тест AOC)

Обсъждане на резултатите

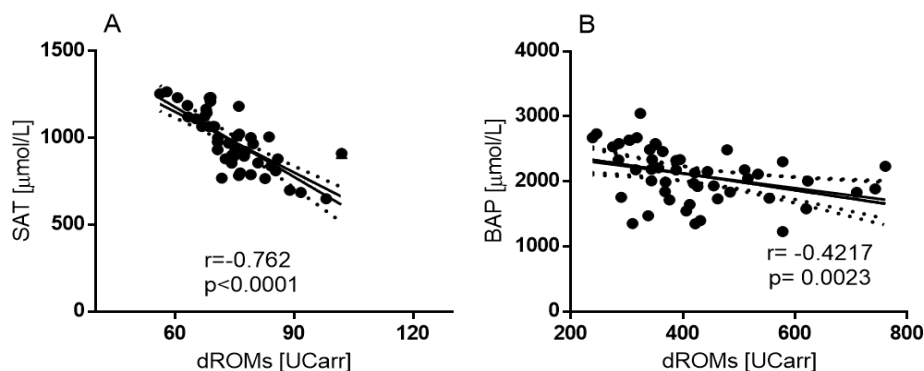
Слюнката се явява първа линия на защитата срещу ОС. Важни източници за ROS в нея са тютюневия дим, пародонтни и други орални заболявания. В настоящето проучване се установяват статистически значимо по-високи стойности на ROS в пациентската група с активна форма на ХВЧЗ спрямо пациентите с лека форма или ремисия, както и спрямо контролната група. Интересно е да се отбележи, че 75% от тях имат стойности, попадащи извън определените от нас референтни граници. Прави впечатление, че нивата на ROS във втората пациентска група, вероятно поради стихване на хроничното възпаление, не се различават значимо от тези на контролните индивиди. Резултатите за AOC, обратно, показват ниски стойности, като най-изявено понижение се наблюдава при пациентите с активна форма на ХВЧЗ. Те се различават статистически значимо както спрямо

контролната група ($p < 0.0001$), така също и спрямо пациентите от групата с лека форма или ремисия ($p < 0.0001$), но отново различие между последната група и контролните индивиди не се наблюдава. В потвърждение на резултатите от настоящето проучване са и други данни от литературата, отбелязващи повишение на слюнчените нива на ROS и намаление на AOC независимо от използваните различни тестове за установяването на оксидативния стрес (Jahanshahi et al., 2004; Abbas and Zaidan, 2017; Finamore et al., 2020). *Като се има предвид, че средните стойности и на двата слюнчени показателя са извън референтния диапазон за пациентите с активност/тежка форма на заболяването, отличаващи се значимо от пациентите в лека форма или ремисия, както и от контролите, дава основание слюнчените ROS и AOC да бъдат предложени като полезни неинвазивни маркери за проследяване активността на процеса при ХВЧЗ.*

Подобно на слюнчените, серумните нива на ROS са значимо по-високи при пациентите с активна форма на заболяването в сравнение с тези с лека форма или в ремисия ($p = 0.012$), както и спрямо контролната група ($p < 0.0001$), но между последните две групи значимо различие не се установява ($p > 0.999$). По отношение на AOC в серум също се наблюдават ниски нива в пациентските групи, отличаващи се значимо от тези в контролната група ($p < 0.0001$). Интересно е, че между двете пациентски групи липсва статистически значимо различие ($p = 0.695$). Може да се заключи, че хронифицирането на възпалителния процес води до трайно намаляване на AOC. Средната стойност на серумните нива на ROS при пациентите с активност на заболяването попада в горно-граничния диапазон на определения от нас референтен интервал, като 33% от стойностите са извън него. Антиоксидантният капацитет в тази група е силно занижен и средната му стойност е под долна референтна граница. Ballini и сътр. (2019), използващи същите като нашите тестове, наблюдават повишени стойности на ROS (436 ± 25 UCarr) и намаление на AOC (1775 ± 125 $\mu\text{mol/L}$) в серума на пациенти с ХВЧЗ, които се нормализират след прилагане на пробиотици, водещо до подобряване на клинична симптоматика. В друго изследване също се изтъква ролята на дисбиозата и недостатъчността на антиоксидантните защитни механизми, които стимулират провъзпалителни реакции и задълбочават чревните увреди (Dudzińska et al., 2018). И други автори установяват значимо намалени нива на серумния AOC, както при пациенти с БК, така и с УК в сравнение с контролните групи (Koutroubakis et al., 2004; Yuksel et al., 2017). Интересно е, да се отбележи, че в проучването на Koutroubakis и сътр. (2004) липсват статистически значими различия в AOC между пациентите с УК с активност на

заболяването в сравнение с тези с неактивно заболяване, докато пациентите с активна форма на БК имат значително по-ниски средни стойности на АОС в сравнение с тези с неактивна форма. Считаме че тези резултати напълно съответстват на нашите, тъй като в нашата пациентска група превалират пациентите с УК (n=40).

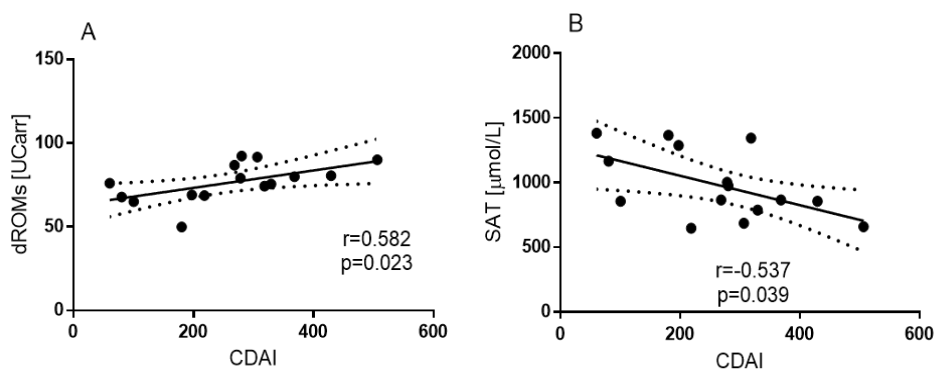
Оксидативният стрес може да бъде един от основните фактори за тъканното увреждане и фиброза, които характеризират БК (Alzoughaibi, 2013). Ху Х. и сътр. (2017) описват патогенетичен механизъм, при който NF-κB възпалителен път, както и отлагането на окислени протеини в мукозата способстват епително-мезенхимния преход, стоящ в основата на фиброзния процес при пациенти с БК. От друга страна добре известен е фактът, че антиоксидантите инхибират производството на възпалителни цитокини (Maor et al., 2008). Така установеният намален АОС при тези пациенти не може да се противопостави достатъчно ефективно на фиброзния процес. Взаимовръзката между нивата на ROS и АОС, измерени в слюнка и серум при пациентите с ХВЧЗ са представени на фигура 41 А, В. Наблюдава се обратна и значима корелационна зависимост между тези показатели и в двата биологични материала, като в слюнката взаимовръзката е висока по сила, а в серума – умерена. По-изявената корелационна зависимост между степента на генериране на ROS и бързото изчерпване на АОС в слюнката в сравнение със серума, вероятно се дължи на по-ограничения набор от антиоксидантни системи в слюнката с основен представител UA. Нека припомним, че в настоящото проучване е установено значимо намаляване на слюнчената UA, особено в подгрупата на пациентите с активност на заболяването, което създава условие за възникване на ОС. *Така може да се заключи, че слюнката, в сравнение със серума, търпи по-значими промени по отношение на факторите, отговорни за възникване на ОС и е подходяща биологична матрица за изследване на ROS и АОС като лабораторни параметри, описващи адекватно ОС.*



Фигура 41. Корелационна зависимост между нивата на генерираните ROS и нивата на АОС в слюнка (А) и серум (В) при пациенти с ХВЧЗ

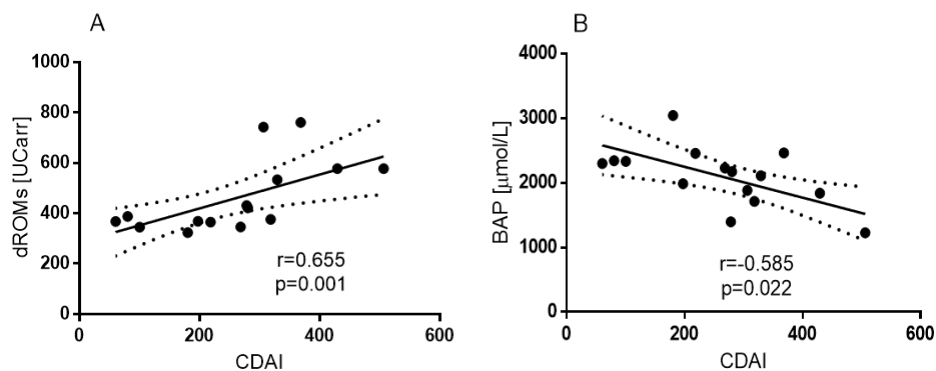
Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (*dROMS – тест за определяне на ROS; **SAT и BAP – тестове за определяне на АОС)

Чрез изследване на корелационните зависимости между степента на активност на изследваните две основни форми на ХВЧЗ (БК и УК) с показателя за генериране на ROS и нивата на АОС може косвено да се докаже ролята на ОС за хода на заболяването и тежестта на възпалението. На фигури 42, 43, 44 и 45 са показани тези корелационни зависимости, като активността на заболяването при пациенти с БК се изразява посредством CDAI, а при пациентите с УК – Mayo индекса.



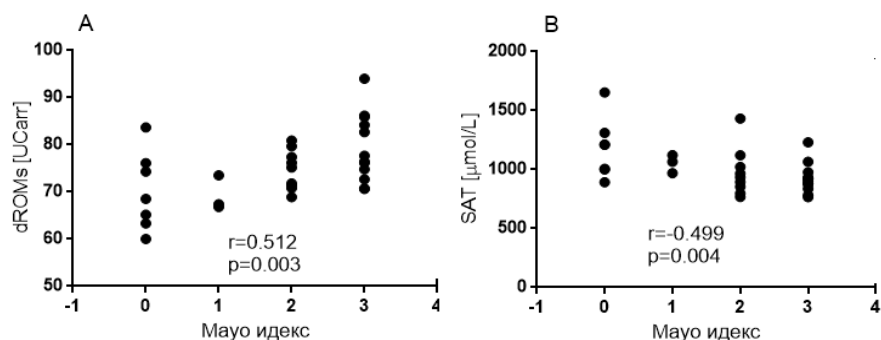
Фигура 42. Корелационна зависимост между CDAI и слюнчени нива на ROS (А) и АОС (В) при пациенти с БК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент. (CDAI – индекс за активност при БК, dROMS – тест за определяне на ROS; SAT – тест за определяне на АОС)



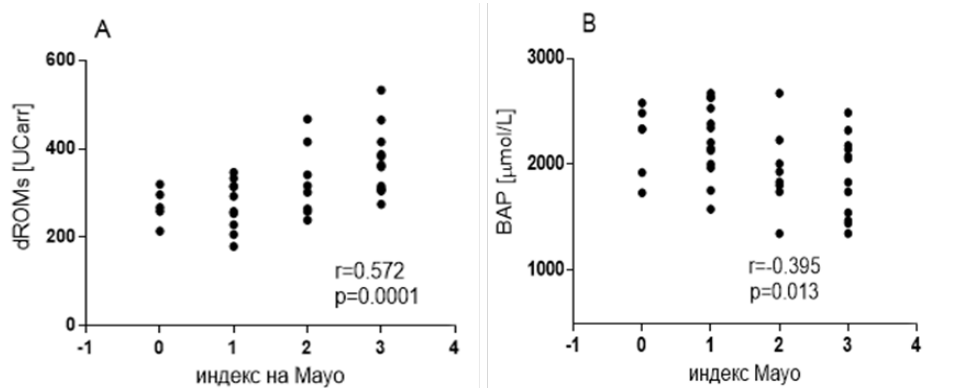
Фигура 43. Корелационна зависимост между CDAI и серумни нива на ROS (A) и AOC (B) при пациенти с БК

Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент. (CDAI – индекс за активност при БК, dROMS – тест за определяне на ROS; BAP – тест за определяне на AOC)



Фигура 44. Корелационна зависимост между Mayo индекс и слюнчени нива на ROS (A) и AOC (B) при пациенти с УК

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



Фигура 45. Корелационна зависимост между Mayo индекс и серумни нива на ROS (A) и AOC (B) при пациенти с УК

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

На посочените фигури ясно се вижда значителната позитивната корелационна зависимост между генерираните ROS и индексите на активност и при двете заболявания, както в слюнка, така и в серум. Напълно логична е наблюдаваната отрицателна корелационна зависимост между AOC и индексите на активност на ХВЧЗ и за двата биологични материала, като зависимостта е значителна по степен с изключение на тази в серум при УК, която е умерена. Наблюдаваните статистически значими корелационни зависимости се явяват като аргумент за патогенетичната роля на ROS при развитието и тежестта на възпалителния процес при ХВЧЗ. *По-силно изявената по степен корелационна връзка в слюнка между активността на заболяването и AOC в сравнение със серума при най-многобройната част от изследваната пациентска група, а именно при пациентите с УК, и почти сравними корелационни зависимости при тези с БК е още едно потвърждение, че слюнката се явява подходящ неинвазивен биологичен материал, който може да се използва при проследяване на пациенти с ХВЧЗ в хода на заболяването.*

В литературата има натрупани не малко данни за възникването на ОС в серум и неговото задълбочаване с хронифициране при ХВЧЗ. Така например Yuksel и сътр. (2017), установяват статистически значими и много високи положителни корелационни зависимости между активността на БК, оценена чрез CDAI, и тази при УК, оценена чрез EIA (ендоскопски индекс за активност), със серумните нива на генерираните ROS, оценени с помощта на друг търговски кит, но почти липсваща и несигнификантна отрицателна корелационна зависимост за AOC в серума на изследваните пациенти. Различните по сила корелационни зависимости в това проучване в сравнение с нашите резултати, вероятно се дължат не само на разлика в дизайна на проучването, но и на използваните различни търговски китове (Total oxidant status – TOS; Total antioxidant capacity – TAC; Rel Assay Diagnostics, Turkey). В друго проучване са изследвани пациенти с БК с тежки рецидиви, изискващи оперативна интервенция (CDAI>200). Установени са статистически значимо по-високи нива на серумни ROS, но неотличаващи се нива на AOC в сравнение с контролите. И при това проучване са използвани различни от нашите търговски китове, съответно за генериране на ROS – Advanced oxidation protein product (AOPP) и Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) и за нивата на AOC – (Ferric reducing ability of plasma (FRAP). Изследвана е и корелационната зависимост между активността на заболяването и показателите за оксидативен стрес. Интересно е, че такава зависимост не се установява, като авторите не дават обяснение на този факт

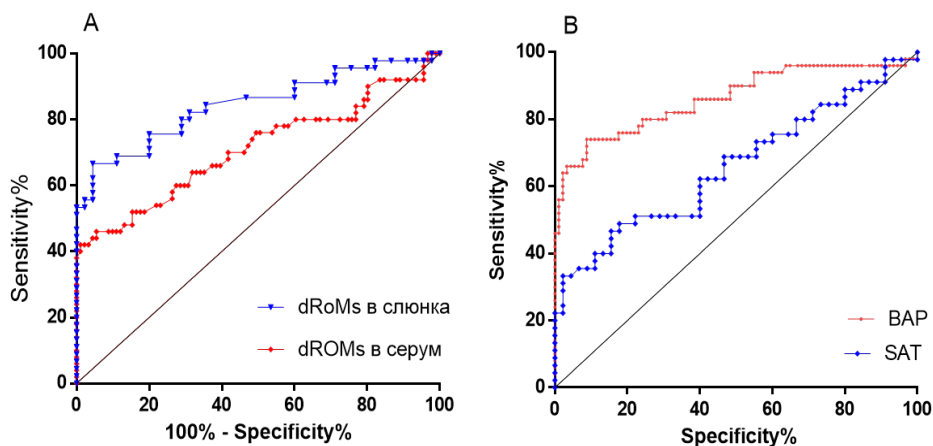
(Luceri et al., 2019). В цитираните проучвания, както и в последващ метаанализ (Krzystek-Korpacka et al., 2020) се подчертават статистически значимо по-високи нива на ROS при изследваните пациенти в сравнение с контролите и въпреки разнопосочните резултати относно корелационната зависимост между показателите на ОС и активността на заболяването се заключава, че ОС стои в основата на патогенетичните механизми на ХВЧЗ.

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

Резултатите, както от литературата, така и от настоящото проучване, показват, че ОС, възникващ вследствие на дисбаланса между прооксиданти и антиоксиданти играе съществена роля не само при иницирането, но и в поддържането на възпалителния процес при ХВЧЗ. *Подчертано по-високите слюнчени и серумни нива на ROS и съответно по-ниските нива на AOC при пациентите с активна форма на ХВЧЗ са основание да се предложат тези параметри като удачни при мониториране на заболяването.*

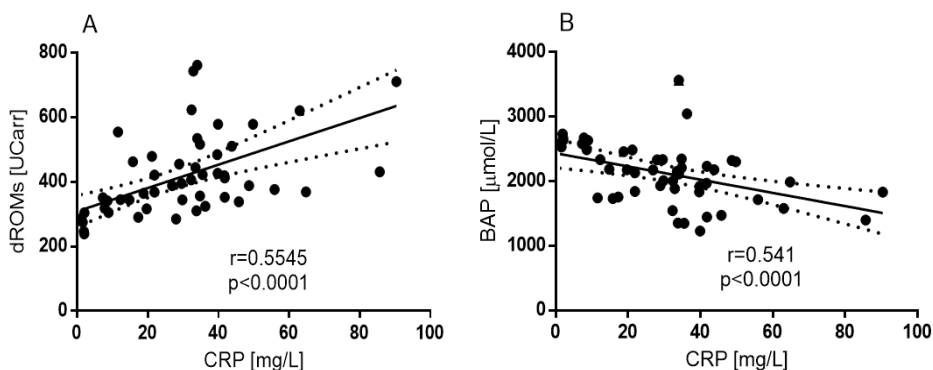
На фигура 46 А и В е посочен диагностичният потенциал на изследваните слюнчени и серумни показатели за генериране на ROS и AOC, оценени с помощта на ROC анализ. Площта под ROC кривата за d-ROMs е по-висока за слюнка (AUC=0.844, $p<0.0001$) в сравнение с тази за серум (AUC=0.710, $p=0.0002$). Обратно площта под ROC кривата за AOC е по-висока за серум (AUC=0.854, $p<0.0001$) в сравнение с тази за слюнка (AUC=0.660; $p=0.009$). В литературата се откриват данни за диагностичния потенциал на показателите за ОС единствено в серум. Така напр. Luceri и сътр. (2019) изследват серум на пациенти с БК и получават резултат относно диагностичната надеждност на използвания от тях тест за генериране на ROS сравними с нашия (AUC=0.694, $p<0.001$; TBARS тест), но относно AOC получават твърде ниска диагностична надеждност (AUC=0.577, $p=ns$; FRAP тест). Доколкото ни е известно, единични са данните за показатели, оценяващи ОС в слюнка при системни заболявания, включително и ХВЧЗ.

От нашите резултати е видно, че слюнчените ROS отразяват в по-добра степен патологичния чревен процес в сравнение с ROS в серум, но слюнченият АОС не е особено информативен, вероятно поради по-ограничения антиоксидантен състав на слюнката с основен представител UA.

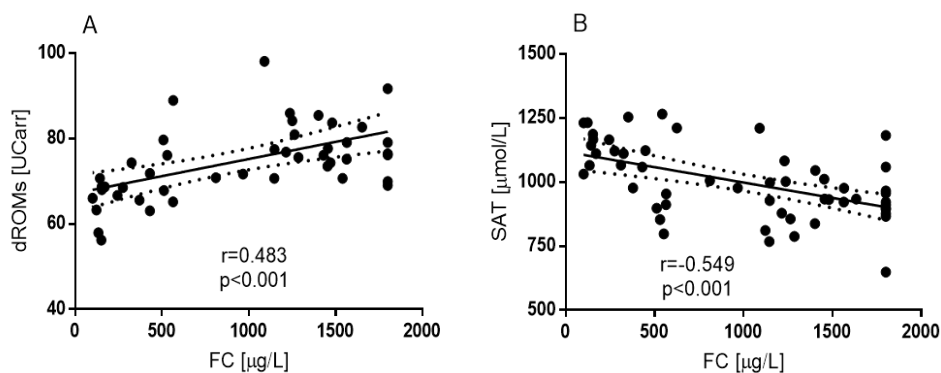


Фигура 46. ROC криви, отразяващи диагностичния потенциал на ROS (A) и АОС (B) в слюнка и серум при пациентите с ХВЧЗ.
(dROMS – тест за определяне на ROS; SAT и BAP – тестове за определяне на АОС)

Сред множеството лабораторни показатели, използвани в лечебно-диагностичния процес при ХВЧЗ, рутинно се използва С-реактивния протеин (CRP) като маркер за системно възпаление. В последното десетилетие се наложи и фекалният калпротектин (FC) като маркер за оценка на локалното чревно възпаление. За оценка на взаимовръзката между хроничното чревно възпаление и оксидативния стрес се осъществи корелационен анализ между серумните и слюнчени нива на ROS и АОС спрямо рутинните лабораторни инфламаторни маркери CRP и FC. Графичното изображение на тези корелационни взаимоотношения са показани на фигури 47 и 48.



Фигура 47. Корелационна зависимост на CRP със серумни нива на ROS (A) и АОС (B) при пациентите с ХВЧЗ
Приложен е параметричен корелационен анализ и изчислен Pearson r коефициент (dROMS – тест за определяне на ROS; BAP – тест за определяне на АОС)



Фигура 48. Корелационна зависимост между FC със слюнчени нива на ROS(A) и AOC (B) при пациентите с ХВЧЗ

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

Резултатите от проведеня корелационен анализ показват статистически значими положителна корелационна взаимовръзка между CRP със серумните нива на ROS и отрицателна корелационна взаимовръзка между CRP и серумния AOC, като и двете зависимости са значителни по сила (фиг. 46). Подобни резултати се откриват и в проучването на Yüksel и сътр. (2017), които установяват умерена отрицателна корелация между нива на CRP и TAC и положителна умерена корелация между CRP и TOS. Проведеният корелационен анализ между маркера, сочещ локалното чревно възпаление (FC) и показателите за ОС в слюнка също доказва статистически значими положителна умерена корелационна взаимовръзка между FC и слюнчени нива на ROS и отрицателна значителни по сила корелационна взаимовръзка между FC и слюнчения AOC (фиг. 47). CRP в серум, както и FC са важни показатели за оценка на болестната активност и риска от рецидив при ХВЧЗ. Каскадата от инфламаторни реакции, активацията на неутрофили и моноцити в мукозата, съпътствани с проинфламаторни цитокини обуславят и генерирането на ROS. Горепосочените значителни корелационни зависимости между CRP, FC и изследваните ROS и AOC са поредното доказателство, че в основата на патогенетичните механизми на хроничния възпалителен процес в червата стои оксидативния стрес.

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

Резултати и обсъждане

Една от основните характеристики на клиничния ход на ХВЧЗ е непрекъснатото редуване на периоди с обостряне и ремисия (Wehkamp et al., 2016). Определянето степента на чревно възпаление играе значителна роля за оценка на тежестта на заболяването, а така също и за терапевтичното му управление. Рутинно измерваните възпалителни маркери, като CRP, СУЕ, WBC и фекален калпротектин (FC) са признати за важни индикатори, както за първоначална диагностика, така и за мониториране на активността на ХВЧЗ (Spiceland and Lodhia, 2018).

CRP е добре познат и рутинно използван като изключително чувствителен и обективен неспецифичен маркер за остро възпаление. Въпреки това са установени индивидуални разлики относно синтеза на CRP в отговор на провъзпалителни агенти, дължащи се на генетичен полиморфизъм на гена (Norouzinia et al., 2017). Той може да бъде нисък при ХВЧЗ, въпреки активното възпаление на чревната лигавица. В допълнение е установена значителна хетерогенност в CRP отговора между двата основни представителя на ХВЧЗ – УК (възпалението е ограничено до мукозата) и БК (възпалението е трансмурално). Така CRP се явява по-надежден маркер в случаите на БК, както и сравнително по-ненадежден при пациентите УК. Въпреки тези недостатъци, редица изследвания установяват умерена корелация на острофазовия белтък с клиничните и ендоскопските находки при пациенти с ХВЧЗ (Chang et al., 2015). СУЕ също се явява неспецифичен индикатор за възпаление. Като нединамичен показател, той не е особено подходящ за проследяване клиничния ход и отговора към терапията при пациентите с ХВЧЗ. Освен това е установено, че СУЕ корелира по-добре с активността при локализация на възпалението в дебелото черво и в много по-малка степен при ангажиране само на тънките черва (Vermeire et al., 2006). Макар че нивата на СУЕ и CRP не винаги добре отразяват ендоскопските промени в червата, резултатите от настоящото проучване с наличното статистически значимо различие между двете пациентски групи и за двата показателя, потвърждават ползването им при мониторирането на клиничния ход на заболяването (табл. 49).

Калпротектинът (СР) е цитоплазмен протеин, секретиран чрез дегранулация на неутрофилните левкоцити и моноцити локално, в мястото на възпаление. Въпреки че той може да бъде открит и измерен в няколко биологични матрици, като плазма, урина, слюнка, синовиална течност, най-разпространено е определянето му във фекална маса. Така в последното десетилетие за мониториране на ХВЧЗ в лабораторната практика се наложи параметърът FC, определян в биологична проба (фецес), взета по неинвазивен начин. Като маркер, отразяващ директно локалния възпалителен и хеморагичен процес в чревната лигавица, той се характеризира с висока диагностична чувствителност и специфичност. След провеждане на редица мета-анализи се приема, че стойности на FC=50÷100 µg/g фекална маса могат да се определят като cut-off стойности за разграничаване на функционалните чревни нарушения от реално чревно възпаление, налагащо последваща диагностична ендоскопия (Van Rheenen et al., 2010; Holtman et al., 2016). Съществуват разнообразие от методи за количествено определяне на FC. За целите на настоящото проучване са използвани два търговски теста на BÜHLMANN, Switzerland. Единият, Quantum Blue®fCAL, с обхват 30÷300 µg/g е предназначен за скриниране на суспектни за ХВЧЗ пациенти и е използван за определяне на FC само в контролната група. Интересно е, че при индивидите от тази група са получени масово стойности под определяемия минимум на теста и само в единични случаи стойностите варират между 30÷50 µg/g. Така средната стойност на FC за контролната група попада под чувствителността на теста (<30 µg/g фекална маса). Другият тест, Quantum Blue®fCAL High Range, е с обхват 100÷1800 µg/g фекална маса и е използван за количествено определяне на FC в пациентските групи.

Резултатите от изследваните рутинни възпалителни маркери в трите проучвани групи са представени в таблица 49.

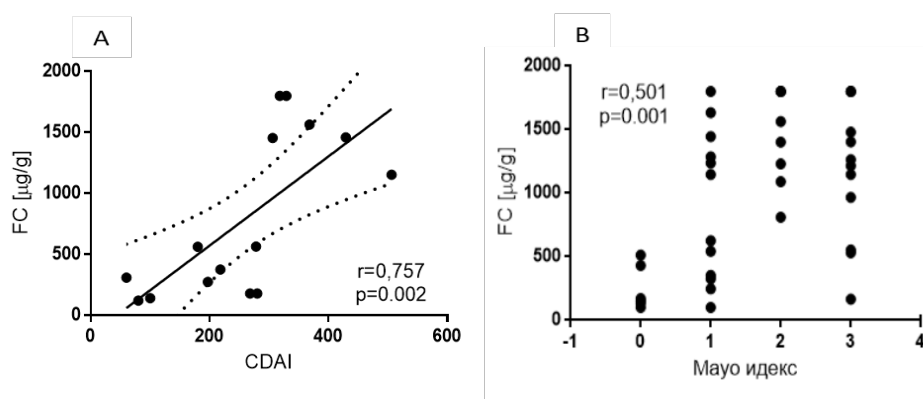
Всички тествани параметри са статистически значимо увеличени в групата на пациенти с активна форма на ХВЧЗ в сравнение както с пациентите с лека форма или ремисия така и с индивидите от контролната група. Статистически значимо различие между пациентите от втората подгрупа с контролната се установяват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

Таблица 49. Рутинни възпалителни маркери, изследвани в трите групи

Параметър (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	p value
WBC (x10 ⁹ /L) (3.5-10.5 x 10 ⁹ /L)	10.8±3.6	8.6±2.8	6.49±1.1	p*=0.030 p**<0.0001 p***=0.018
СУЕ (mm/h) (до 20 mm/h)	36.8±16.7	25.7±12.2	14.98±3.2	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=ns
CRP (mg/L) (до 5 mg/L)	30.9±25.2	10.3±7.5	2.38±1.6	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=ns
FC (µg/g) (<50 µg/g)	1403.1±452.9	293.8±162.1	<30.0	p*<0.0001 p**<0.0001 p***=0.0005

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

За да определим клиничната значимост на FC при пациентите с ХВЧЗ, потърсихме асоциации между FC и изчислените индекси на клиничната активност на заболяванията които са представени на фигура 49 А, В. Статистически значима (p=0.0016) и висока по степен корелационна връзка (Spearman r=0.757) се установява между нивата на FC и индекса на активност при пациентите с БК (CDAI). При пациентите с УК също се установява статистически значима (p=0.0012) и значителна по степен корелация (Spearman r=0.501) с Mayo индекс.



Фигура 49. Корелационна зависимост между клиничната активност при ХВЧЗ и FC при: А) пациенти с БК (CDAI) и В) пациенти с УК (Mayo индекс)

Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

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

Осъществен е корелационен анализ на зависимостта между активността/тежестта на заболяването, оценена чрез позитивната предиктивна стойността на FC=250 $\mu\text{g/g}$ фекална маса в общата пациентска група (УК+БК) и използваните рутинни възпалителни маркери. Логично е да се получи висока и статистически значима корелационна зависимост с FC (Spearman $r=0.825$, $p<0.0001$). Рутинните възпалителни маркери се подреждат в низходящ ред според изчисления корелационен коефициент както следва: CRP със Spearman $r=0.449$ и $p<0.001$; СУЕ със Spearman $r=0.374$ и $p=0.005$; WBC – Spearman $r=0.184$ и $p=\text{ns}$. Така сред съпоставените възпалителни маркери CRP се оказва като най-добър показател след FC, СУЕ е умерено информативен, докато WBC не е информативен по отношение активността/тежестта на заболяването. В мета-анализа на Chang и сътр. (2015) се предоставят данни, сходни с нашите резултати: например Sirponen и сътр. (2010) установяват корелация на клинично-ендоскопските данни (CDEIS) с CRP, възлизаща на $r=0.608$, а с FC – $r=0.831$ при пациенти с БК, докато Lobatón и сътр

(2013) установят при пациенти с УК корелационна зависимост между клинично-лабораторно-ендоскопските данни, представени чрез Mayo индекса, и CRP, възлизаща на $r=0.307$, а за FC – $r=0.727$. С други думи резултатите от настоящото проучване потвърждават предимството на локалния маркер за чревно възпаление пред останалите възпалителни маркери.

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

При ХВЧЗ често се наблюдава желязо-дефицитна анемия в резултат на хронично протичащото възпаление и/или продължително кървене. В настоящото проучване се установиха стойности на серумно желязо 8.71 ± 4.43 $\mu\text{mol/L}$ при пациентите с ХВЧЗ срещу 16.2 ± 4.6 $\mu\text{mol/L}$ в контролната група ($p<00001$). Установи се и статистически значима, но слаба корелация между стойностите на FC с нивата на серумното желязо (Spearman $r=-0.29$, $p<0.035$).

В последното десетилетие фекалният калпротектин все повече се доказва като изключително полезен неинвазивен и икономически ефективен възпалителен маркер, който надеждно отразява хроничния възпалителен процес в червата. Резултатите от настоящото проучване също потвърждават възможността надеждно да се разграничават пациенти с различна степен на активност/тежест на заболяването, както и да предсказва появата на усложнения. Така този сравнително нов биомаркер се очертава като показател, който ще се наложи в-рутинната клинично-лабораторна практика за диагностика, мониториране и терапевтично управление на хроничните чревни възпалителни заболявания.

Аденозиндезаминаза като нов биомаркер при проследяване на пациенти с ХВЧЗ.

Основна характеристика при хроничните чревни заболявания е засилената миграция и задържане на ефektorни макрофаги, неутрофили и Т-лимфоцити във възпалените участъци на червата, където те активират и освобождават възпалителни цитокини. Това води до локално увеличение на IL-12, IL-17, TNF-алфа и IFN-гама, участващи в хроничното чревно възпаление при пациенти с БК, докато при пациенти с УК е установено значително увеличение на IL-13 (Th-2), играещо роля в поддържане на хроничното възпаление чрез хиперплазия на бокалните клетки и хиперсекреция на слюз (Takiishi, et al., 2017; Kim and Cheon, 2017). ADA е важен ензим на вътре- и извънклетъчния метаболизъм на пуриновите нуклеотиди. Доказано е, че повлиява клетъчната имунна активност и участва в патогенетичните механизми при различни хронични възпалителни заболявания (туберкулоза, лайшманиоза, белодробни, автоимунни и невродегенеративни заболявания, сепсис, лимфоми, остър хепатит, ХИВ и др.). Ролята на ADA в патофизиологията на ХВЧЗ е все още ненапълно изяснена. Счита се, че пролиферацията и диференциацията на лимфоцитите, както и моноцито-макрофагеалната система са отговорни за промените в активността на ADA. Цитокиновата възпалителна каскада с активиране на Т-клетъчния отговор също може да е отговорна за повишаване на активността на ADA (Kim and Cheon, 2017). Ензимът АДА се открива не само в цитозола, но и по плазмената мембрана на много видове клетки. Благодарение на ензимната си активност и експресията си върху Т-лимфоцитите и дендритните клетки, ектоензимът регулира локалната извънклетъчна концентрация на аденозин. В този контекст ADA представлява критичен регулатор на нивата на ендогенния аденозин на мястото на възпалението. Немалко изследвания подкрепят участието на аденозиновите пътища в намаляването на аномалните възпалителни реакции. Извънклетъчният аденозин играе двойка роля: от една страна, той е алармен сигнал за увреждане на тъканите, а от друга, той играе защитна роля (Antonioli et al., 2008). Чрез рецепторен механизъм аденозинът модулира ентералните имунни и възпалителни реакции, като упражнява противовъзпалително действие. Предполага се, че аденозинът е модулатор на двигателната и секреторна активност на червата и регулира/променя предаването на болката. Повишените нива на извънклетъчен аденозин, чрез активиране А2А рецептор върху Т-лимфоцитите, може селективно да потискат експресията на провъзпалителни цитокини, отговорни за хроничното възпаление. За разлика от това, активирането на А2В рецепторите върху чревните

епителни клетки обратно, води до провъзпалителен ефект, засилено производство на IL-6 и активиране на неутрофилите (Antonioli et al., 2012; 2019).

Резултати и обсъждане

ADA е недостатъчно познат и малко изследван показател при ХВЧЗ. Като маркер на клетъчно-медиацията имунен отговор отразява активацията на левкоцитите при чревно възпаление (Fredholm, 2007). Установени са повишени серумни нива на ADA при пациенти с активна форма на БК, като нивата им намаляват и могат да достигнат нормални граници в периодите на ремисия (Fengming and Jianbing, 2014). Подобни резултати са докладвани и за пациенти с УК (Beyazit et al., 2012; Sharan and Rajesh 2014). По тези причини АДА привлече вниманието ни като обещаващ нов биомаркер, който би могъл да бъде полезен при мониторирането на пациенти с ХВЧЗ. Резултатите от настоящото проучване относно серумните нива на ензима в трите изследвани групи са представени в таблица 50.

Таблица 50. Серумни нива на ADA в трите изследвани групи

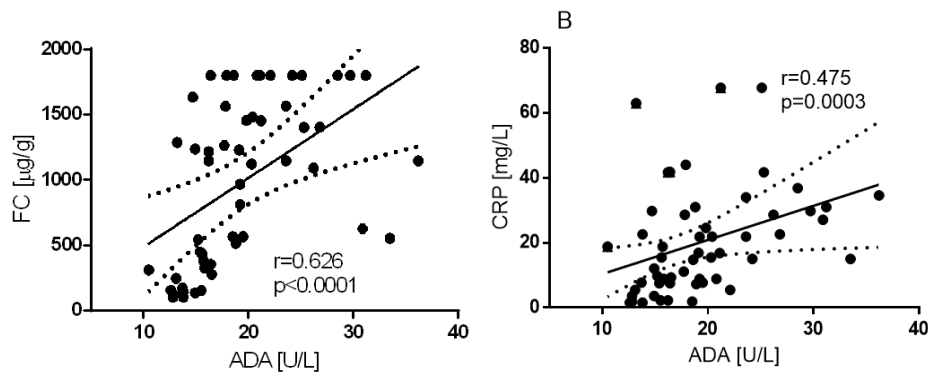
Параметър (мерна единица) Референтни граници	Активна форма на ХВЧЗ (mean±SD)	Лека форма/ ремисия (mean±SD)	Контролна група (mean±SD)	<i>p</i> value
ADA (U/L) (до 18 U/L)	21.6±5.6	14.6±1.3	9.5±3.0	p* < 0.0001 p** < 0.0001 p*** = 0.0005

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

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

Корелационният анализ между нивата на ADA и рутинните лабораторни маркери за възпаление (фигура 50) показва значителна положителна корелация с FC (Spearman $r=0.626$; $p<0.0001$) и умерена положителна корелация (Spearman $r=0.475$; $p<0,001$) със

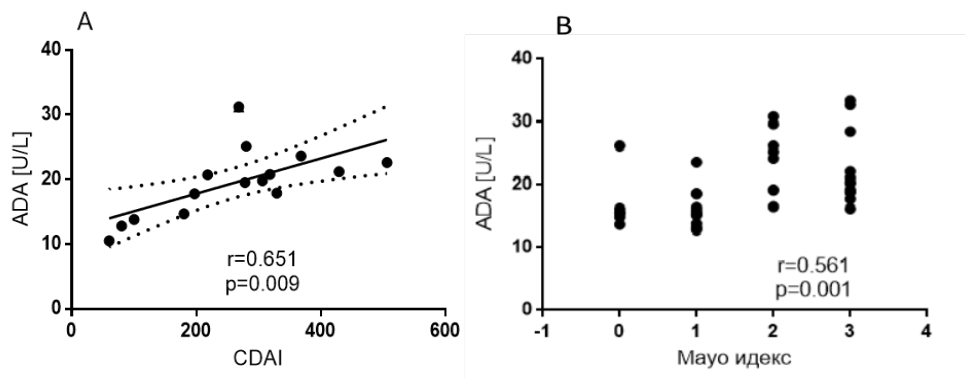
CRP (фиг. 50). Такава корелационна връзка липсва между ADA и СУЕ (Spearman $r=0.16$; $p=ns$), както и с WBC (Spearman $r=0.11$, $p=ns$).



Фигура 50. Корелационна зависимост между активността на ADA с FC (A) и CRP (B) при пациенти с ХВЧЗ

Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

За да определим клиничната значимост на ADA при пациентите с ХВЧЗ, потърсихме асоциации между ензима и изчислените индекси на клиничната активност на заболяванията, които са представени на фигура 51 А, В. Статистически значима ($p=0.009$) и значителна по степен корелационна връзка (Spearman $r=0.651$) се установява между нивата на ADA и индекса на активност при пациентите с БК (CDAI). При пациентите с УК също се установява статистически значима ($p=0.001$) и значителна по степен корелация (Spearman $r=0.561$) с Мауо индекс.



Фигура 51. Корелационна зависимост между клиничната активност при ХВЧЗ и ADA при: А) пациенти с БК (CDAI) и В) пациенти с УК (Мауо индекс)

Приложен е непараметричен анализ и изчислен Spearman r коефициент

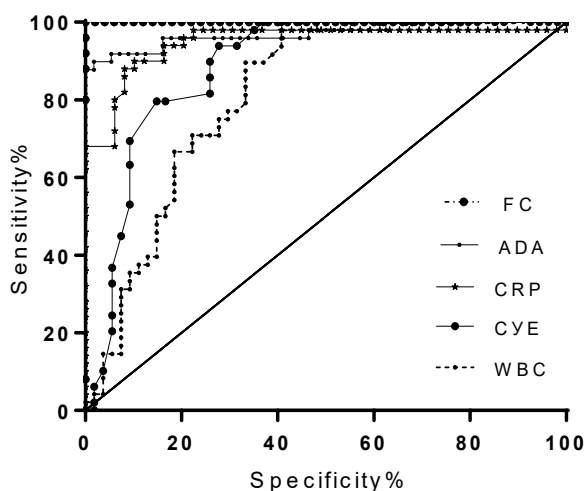
Диагностичната надеждност както на рутинните възпалителни маркери, така и на новия маркер АДА е оценена посредством ROC анализ, като са съпоставени резултатите

от всички пациенти с ХВЧЗ с тези на контролната група. Площите под ROC кривите са представени на таблица 51 и графично онагледени на фигура 52.

Таблица 51. Диагностичен потенциал на възпалителните маркери при пациентите с ХВЧЗ

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

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



Фигура 52. ROC криви на възпалителните маркери при пациентите с ХВЧЗ.
(ROC – Receiver operating characteristic curve)

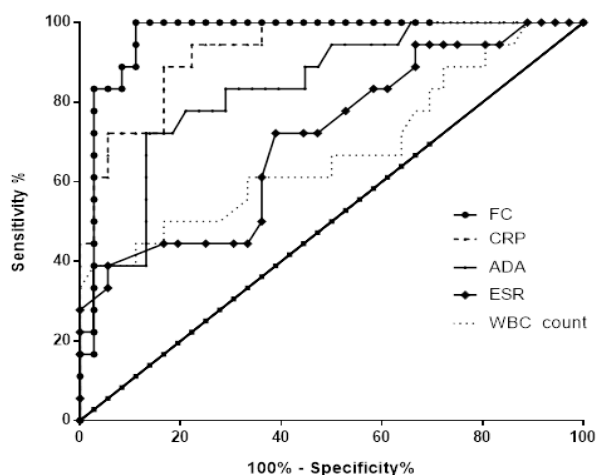
Прави впечатление, че площта под ROC кривата на FC, като параметър, отразяващ директно локалните възпалителни промени в чревната лигавица, е близка до единицата. Така, неслучайно, FC се характеризира с изключително висока диагностична чувствителност и специфичност. От всички останали изследвани показатели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

форма на заболяването спрямо тези с лека форма или ремисия. Резултатите от този анализ са посочени в таблица 52 и онагледени на фигура 53.

Таблица 52. Потенциал на изследваните възпалителни маркери за дискриминиране на пациентите с различна активност/тежест на ХВЧЗ.

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

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



Фигура 53. ROC криви относно потенциала на изследваните възпалителни маркери за дискриминиране на пациентите с различна активност/тежест на ХВЧЗ.

(ROC – Receiver operating characteristic curve)

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

Изводи:

Проведените два типа ROC анализи недвусмислено доказват диагностичната стойност на ензима ADA по отношение на диагностиката и проследяването на пациентите с ХВЧЗ. Като се има предвид, че методът, с който се изследва ADA, е лесно изпълним, неизискващ специална апаратура и е с ниска себестойност, може да бъде предложен като допълнителен биомаркер в панела от рутинни показатели за изследване на пациентите с ХВЧЗ.

Хроничните възпалителни чревни заболявания изискват навременна диагноза, мониториране хода на възпалението, както и оценка на ефикасността на лечението и риска от възникване на усложнения. В този аспект нараства нуждата от търсене на нови маркери, изследвани в различни биологични материали, добити чрез неинвазивни процедури, за да се намали броя на неизбежните и в същото време неприятни и рискови за пациента ендоскопии.

В настоящото проучване се установява, че хроничният възпалителен процес в черва оказва съществено влияние върху състава на слюнката. Промените за всички изследвани слюнчени параметри са особено подчертани във фазите на обостряне и активност на заболяването, достигащи до статистически значими различия в сравнение с тези, наблюдавани при пациенти в лека форма или ремисия на заболяването, чиито стойности на параметрите са близки до тези на контролната група.

Измежду всички изследвани слюнчени показатели LDH, sIgA и sAA се открояват с по-добра информативна стойност в сравнение със съответните им серумни показатели по отношение мониториране хода на ХВЧЗ и би могло да бъдат предложени като удачни и подходящи маркери за установяване фазите на активност и обостряне на заболяването. Обратно серумните TP и ALB превъзхождат слюнчените по отношение на възможността им да показват ефекта на хроничния възпалителен процес върху общото състояние и метаболитни промени при всички пациенти с ХВЧЗ, но за разлика от тях трудно би могло да се използват за разграничаване на фазите на активност на заболяването, ако са прилагани самостоятелно.

В не малко проучвания се предоставят данни за промени в нивата на различни серумни показатели, характеризиращи оксидативния стрес (ОС), възникващ при ХВЧЗ. В настоящото проучване, освен че се потвърждава нарушеният баланс между оксиданти/прооксиданти в серума на пациенти с ХВЧЗ, се установява подобен нарушен

баланс и в слюнката на тези пациенти. Изследване нивата на ROS и AOC, в съчетание с определяне нивата на UA и нитрити в слюнка имат своето обосновано приложение при мониториране хода на ХВЧЗ. Установените корелационни зависимости на слюнчените показатели за ОС с индексите на активност на ХВЧЗ, както и с FC дават основание те да се предложат като удачни и неинвазивни показатели при мониториране хода на ХВЧЗ.

Допълнителна светлина за хода на хроничния възпалителен процес хвърля и промененият клетъчен състав на слюнката. За всички изследвани клетъчни видове се установяват статистически значими различия в броя им при трите изследвани групи. Като се вземе обаче в съображение широкият референтен диапазон, единствено броят на левкоцитите в слюнка се оказва удачен за изследване и би могъл да се използва като допълнителен параметър, характеризиращ задълбочаването на хроничния възпалителен процес в червата.

В настоящото проучване е изследвана и информативната стойност на фекалния калпротектин като модерен, но все още нешироко използван параметър, който отразява директно локалните възпалителни промени в червата. Потвърдена е изключителната висока надеждност на показателя по отношение на корелацията му с индексите на активност на ХВЧЗ и възможността да разграничава пациентите с различна степен на активност/тежест на заболяването, както и да предсказва появата на усложнения в бъдеще. Това дава основание FC да се предложи за рутинно използване в клинично-лабораторна практика за диагностика, мониториране и терапевтично управление на хроничните чревни възпалителни заболявания, с което да се намали броят на инвазивните и тежки за пациентите ендоскопски изследвания.

Проучен е и нов серумен биомаркер – аденозиндезаминаза (ADA). По отношение на диагностичния си потенциал ADA превъзхожда всички останали изследвани и рутинно използвани серумни показатели и се доближава в най-голяма степен до този на FC. Освен това по отношение на възможността да разграничава пациентите с активност на заболяването от тези в ремисия отстъпва леко на FC и CRP, но е значително по-добър параметър от широко използваните CUE и WBC. Резултатите ни недвусмислено доказват диагностичната стойност на ензима ADA по отношение на диагностиката и проследяването на пациентите с ХВЧЗ. Не без значение е и фактът, че методът, с който се изследва ADA, е лесно изпълним, неизискващ специална апаратура и е с ниска себестойност. Всичко това дава основание ензимът ADA да бъде предложен като

допълнителен биомаркер в панела от рутинни показатели за изследване на пациентите с ХВЧЗ.

Като общо заключение може да се посочи, че ХВЧЗ са предизвикателство пред клиницистите, както в диагностично отношение, така и при мониториране хода на заболяването и управление на терапевтичния подход. Лабораторната медицина продължава да търси нови високочувствителни и специфични биомаркери, за да се спестят инвазивните и травмиращи за пациентите ендоскопски изследвания. В това отношение показателите FC и серумна ADA се очертават с много добра перспектива и вероятно скоро ще заемат подобаващо място в рутинната клинично-диагностична практика. Слюнката е все още недостатъчно изследвана биологична матрица, но предлага обещаващи нови допълнителни и достъпни, получени посредством напълно неинвазивни и необременяващи процедури параметри, които адекватно характеризират болестния процес при тези тежки хронични заболявания, протичащи понякога с десетилетия.

VI. ИЗВОДИ

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

параметри и индексите на активност на ХВЧЗ, както и с ендоскопската находка при хроничния гастрит потвърждават тяхната патогенетична роля за възпалителния процес и обуславят възможността да бъдат проследявани в хода на патологичния процес.

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

VII. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

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

Приноси с потвърдителен характер:

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

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

10. Йорданова М., Д. Герова, А. Атанасова, Б. Галунска, Слюнчени биомаркери при хронични възпалителни чревни заболявания. XII Национална конференция по клинична лаборатория 4 - 6 октомври 2019, Ахелой, България
11. Yordanova M., Gerova D., Atanasova A., Galunska B., Oxidative status in patients with inflammatory bowel disease, XXVII Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting BCLF 2019 Анталия, Турция

IX. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abbas AW, Zaidan TF, Al-Barrak AY. Assessment of serum and salivary ceruloplasmin level in patients with oral lichen planus. *J Bagh Coll Dent* 2014; 26(3):53-7
2. af Björkesten CG, Nieminen U, Turunen U, Arkkila P, Sipponen T, Färkkilä M. Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(5):528-537.
3. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018 Apr;53(4):379-389. doi: 10.1080/00365521.2018.1447597.
4. Ahmadiashar A, Mohsenifard MR, Mazloomzadeh S. Evaluation of serum & salivary IgA in patients with type 1 diabetes. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122757. Published 2015 Apr 13. doi:10.1371/journal.pone.0122757
5. Ahmed Z, Lysek M, Zhang N, Malik TA. Association Between Serological Markers and Crohn's Disease Activity. *J Clin Med Res.* 2020;12(1):6-12. doi:10.14740/jocmr4016
6. Akhiani AA, Stensson A, Schön K, Lycke NY (2005) IgA antibodies impair resistance against *Helicobacter pylori* infection: studies on immune evasion in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 174: 8144-8153.
7. Aksenenko, M., Palkina, N., Komina, A. et al. Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin. *BMC Dermatol* 19, 1 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12895-018-0081-1>
8. Alhajj M, Babos M. Physiology, Salivation.. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2020: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542251/>
9. Allen S. Salivary Alpha-Amylase as an Indicator of Body Stress Following an Acute Session of Repetitive Jumping. *UNLV Theses, Dissertations, Professional Papers, and Capstones,* 2014;
10. Almståhl A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):345-352. doi:10.1034/j.1399-302x.2001.160605.x
11. Al-Muhtaseb SI. Serum and saliva protein levels in females with breast cancer. *Oncol Lett.* 2014;8(6):2752-2756. doi:10.3892/ol.2014.2535
12. Alshahrani I, Hameed MS, Syed S, Amanullah M, Togoo RA, Kaleem S. Changes in essential salivary parameters in patients undergoing fixed orthodontic treatment: A longitudinal study. *Niger J Clin Pract.* 2019;22(5):707-712. doi:10.4103/njcp.njcp_606_18
13. Altun E, Yildiz A, Cevik C, Turan G. The role of high sensitive C-reactive protein and histopathological evaluation in chronic gastritis patients with or without *Helicobacter pylori* infection. *Acta Cir Bras.* 2019 Mar 21;34(3):e201900310. doi: 10.1590/s0102-865020190030000010.
14. Alzoghaibi M.A., Al-Mofleh I.A., Al-Jebreen A.M. Antioxidant activities for superoxide dismutase in patients with Crohn's disease. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2014; 25:59–62. doi: 10.1515/jbcpp-2013-0042.
15. Alzoghaibi MA. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19(39):6540-6547. doi:10.3748/wjg.v19.i39.6540

16. Andriollo-Sanchez, M., Hininger-Favier, I., Meunier, N. et al. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr* 59, S58–S62 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602300>
17. Anjum A, Hosein M. Diagnostic importance of saliva – an overview . *J Pak Dent Assoc* 2019;28(3):129-135.
18. Annibale B, Capurso G, Delle Fave G (2003) The stomach and iron deficiency anaemia: a forgotten link. *Dig Liver Dis* 35: 288-295.
19. Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter*. 2017;22(4):10.1111/hel.12386. doi:10.1111/hel.12386
20. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. The purinergic system as a pharmacological target for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Pharmacol Rev* 2019;71:345-82
21. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders., *Curr Drug Targets*. 13(6), 842-62 (2012).
22. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, et al. Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacol Ther* 2008;120:233-53 (PMID: 188488)
23. Aps JK, Van den Maagdenberg K, Delanghe JR, Martens LC. Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta*. 2002;321(1-2):35-41. doi:10.1016/s0009-8981(02)00062-1
24. Arbabi-Kalati F., Salimi S., Vaziry-Rabiee A, and Noraei M., “Effect of mobile phone usage time on total antioxidant capacity of saliva and salivary immunoglobulin A,” *Iranian Journal of Public Health*, vol. 43, no. 4, pp. 480–484, 2014.
25. Arhakis A, Karagiannis V, Kalfas S., Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults. *Open Dent J*. 2013. PMID: 23524385
26. Arregger AL, Cardoso EM, Tumilasci O, Contreras LN. Diagnostic value of salivary cortisol in end stage renal disease. *Steroids*. 2008;73(1):77–82. doi: 10.1016/j.steroids.2007.09.001.
27. Avdagić N, Zaćiragić A, Babić N, et al. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. *Bosn J Basic Med Sci*. 2013;13(1):5-9. doi:10.17305/bjbms.2013.2402
28. Azimi E, Zarei F, ValadBeigi Sh, et al. Adenosine deaminase (ADA) activity and isozymes in the serum of patients with hepatitis B compared with healthy people: a useful method in diagnosis clinical status. *Arch Med Lab Sci*. 3(1),15-20 (2017).
29. Azramezani Kopy T, Shahrokh S, Mirzaei S, Asadzadeh Aghdaei H, Amini Kadijani A. The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: a review study. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019;12(3):183-189.
30. Babu NC, Gomes AJ. Systemic manifestations of oral diseases. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*. 2011;15(2):144-147.
31. Bafghi AF, Tabrizi AG, Bakhshayi P. The Effect of Smoking on Min6. eral and Protein Composition of Saliva. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2015; 27(81): 301-305, indexed in Pubmed: 26788479).
32. Bahgat MH, El-Etreby SA. Bio-markers of inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Austin J Gastroenterol* 2017;4:1082-1087
33. Baik, S.-C., H.-S. Youn, M.-H. Chung, W.-K. Lee, M.-J. Cho, G.-H. Ko, C.-K. Park, H. Kasai, and K.-H. Rhee. 1996. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res*.56:1279-1282

34. Bakhtiari S, Toosi P., Samadi S., Bakhshi M., Assessment of uric acid level in the saliva of patients with oral lichen planus, *Med Princ Pract*, 26 (1) (2017), pp. 57-60 .
35. Ballini A., Santacroce L, Cantore S, et al. Probiotics Efficacy on Oxidative Stress Values in Inflammatory Bowel Disease: A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Pilot Study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2019;19(3):373-381. doi:10.2174/1871530319666181221150352
36. Balmus IM, Ciobica A, Trifan A, Stanciu C. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. *Saudi J Gastroenterol*. 2016;22(1):3-17. doi:10.4103/1319-3767.173753
37. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116: 281–297
38. Basu MK, Smith AJ, Walsh TF, Saxby MS. Albumin in saliva during experimentally induced gingivitis. *J Dent Res*. 1984;63:514.
39. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):189-194. doi:10.1034/j.1600-051x.2002.290301x.x
40. Bavishi C, Dupont HL. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Dec;34(11-12):1269-81. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04874.x. Epub 2011 Oct 17. PMID: 21999643.
41. Bel'skaya LV, Sarf EA, Kosenok VK. Correlation interrelations between the composition of saliva and blood plasma in norm. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*. 2018;63(8):477-482. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-477-482.
42. Benedetti S, Primiterra M, Finco A, Canestrari F, Cornelli U. Validation of a patented method to determine the antioxidant capacity of human saliva based on the reduction of iron: the SAT test. *Clin Lab*. 2014;60(3):475-482. doi:10.7754/clin.lab.2013.130243
43. Benet Dhas et al., Role of Calprotectin in Infection and Inflammation, *Curr Pediatr Res* 2012; 16 (2): 83-94
44. Bennet KR, Reade PC. Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers, and patients with minor aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;53(5):461-465. doi:10.1016/0030-4220(82)90457-1
45. Berkowitz L, Schultz BM, Salazar GA, et al. Impact of Cigarette Smoking on the Gastrointestinal Tract Inflammation: Opposing Effects in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Frontiers in Immunology*. 2018 ;9:74. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00074.
46. Bernabucci U, Colavecchia L, Danieli PP al.,(2011) Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol In Vitro* 25:684–691
47. Beyazit Y, Koklu S, Tas A, et al. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2012;6:102-7
48. Bhatia K, Elmarakby AA, El-Remessy AB, Sullivan JC. Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 May 15;302(10):R1233.. doi:10.1152/ajpregu.00546.2011
49. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014;94(2):329-354. doi:10.1152/physrev.00040.2012

50. Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, Poli G. Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(14):1711-1747. doi:10.1089/ars.2012.4530
51. Bilancio G, Cavallo P, Lombardi C, et al. Saliva for assessing creatinine, uric acid, and potassium in nephropathic patients. *BMC Nephrol*. 2019 Jul 4;20(1):242. doi: 10.1186/s12882-019-1437-4. PMID: 31272423; PMCID: PMC6609386.
52. Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS, et al. Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med*. 2000 Nov 1;29(9):881-8. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00391-9. PMID: 11063913
53. Bishehsari F, Magno E, Swanson G, et al. Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Res*. 2017;38(2):163-171.
54. Björne H., Petersson J., Phillipson M, Weitzberg E, Holm L., Lundberg J., Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness, *J Clin Invest*. 2004 Jan 1; 113(1): 106–114. doi: 10.1172/JCI200419019.
55. Block G, Dietrich M, Norkus EP, et al., Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol*. 2002;156:274–285. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwf029> .
56. Bokemeyer B. Asymptomatic elevation of serum lipase and amylase in conjunction with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Z Gastroenterol*. 2002 Jan;40(1):5-10. doi: 10.1055/s-2002-19636
57. Bondonno CP., Liu AH., Croft KD., et al., Short-term effects of nitrate-rich green leafy vegetables on blood pressure and arterial stiffness in individuals with high-normal blood pressure. *Free Radic. Biol. Med*. 2014 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.021.
58. Bonner A., Almogren A, Furtado PB, Kerr MA, Perkins SJ. Location of secretory component on the Fc edge of dimeric IgA1 reveals insight into the role of secretory IgA1 in mucosal immunity *Mucosal Immunology* volume2, pages74–84 (2009)
59. Bourgonje AR, von Martels JZH, Bulthuis MLC, et al. Crohn's Disease in Clinical Remission Is Marked by Systemic Oxidative Stress. *Front Physiol*. 2019;10:499. Published 2019 Apr 26. doi:10.3389/fphys.2019.00499
60. Brandtzaeg P. Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity. *Benef Microbes*. 2010 Sep;1(3):211-27. doi: 10.3920/BM2010.0009.
61. Brunelli E, Domanico F, La Russa D, et al. Sex differences in oxidative stress biomarkers. *Curr Drug Targets*. 2014;15(8):811-815. doi:10.2174/1389450115666140624112317
62. Bruno G, Rocco G, Zaccari P, Porowska B, Mascellino MT, Severi C. Helicobacter pylori Infection and Gastric Dysbiosis: Can Probiotics Administration Be Useful to Treat This Condition?. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018;2018:6237239. doi:10.1155/2018/6237239
63. Buduneli N. Effects of Tobacco Smoking on Chronic Periodontitis and Periodontal Treatment. *Intech Open*, 2012: 81-96. DOI: 10.5772/39169.
64. Bulajic M, Panic N, Löhr JM. Helicobacter pylori and pancreatic diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5(4):380-383. doi:10.4291/wjgp.v5.i4.380
65. Butler JE, Spradling JE, Rowat J, Ekstrand J, Challacombe SJ. Humoral immunity in root caries in an elderly population. 2. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5(3):113-120. doi:10.1111/j.1399-302x.1990.tb00408.x
66. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2011;17(35):3905-3932. doi:10.2174/138161211798357719

67. Calouius P.E.B. Leucocytes in the Saliva in Normal and Abnormal Subjects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1958; v11(1): 43-46
68. Cappello M, Morreale GC. The Role of Laboratory Tests in Crohn's Disease. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2016;9:51-62. Published 2016 Aug 18. doi:10.4137/CGast.S38203
69. Capurso G, Ricci R, Panzuto F, et al. Intragastric ascorbic but not uric acid is depleted in relation with the increased pH in patients with atrophic body gastritis and *H. pylori* gastritis. *Helicobacter*. 2003;8(4):300-306. doi:10.1046/j.1523-5378.2003.00157.x
70. Cardenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Am J Epidemiol*. 2006;163(2):127–34.
71. Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Minelli A, Mugnai C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Reprod Nutr Dev*. 2003 Jan-Feb;43(1):91-103. doi: 10.1051/rnd:2003008. PMID: 12785452.
72. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:273-93.
73. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*. 2008 Jun;28(6):740-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001. PMID: 18549797; PMCID: PMC3057455.
74. Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(40):11246-11259. doi:10.3748/wjg.v21.i40.11246
75. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*, 2007; 43: 160-232. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2006.00178.x, indexed in Pubmed: 17214840)
76. Chatterjee S. Saliva as a forensic tool. *J Forensic Dent Sci*. 2019;11(1):1-4. doi:10.4103/jfo.jfds_69_18).
77. Chen and Gibson S.B, “Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy?” *Autophagy*, vol. 4, no. 2, pp. 246–248, 2008.
78. Chen L, Liu F, Fan X, et al. 2009. Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues. *Int. J. Infect. Dis*. 13:20–23
79. Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, Belyaeva YY, Shkurupiy VA. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res*. 2014;2014:762514. doi: 10.1155/2014/762514.
80. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*, 2007, 383(1-2), 30-40.
81. Chiaro TR, Soto R, Zac Stephens W, Kubinak JL, Petersen C, et al. (2017). A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice. *Sci Transl Med* 9.
82. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. (2014) 13:463–6. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.028
83. Conrad K, Schmechta H, Klafki A and Lobeck G: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002Feb;14(2):129-3
84. Coopman R, Speeckaert MM, Aps JK, Delanghe JR. Flow cytometry-based analysis by Sysmex-UF1000i® is an alternative method in the assessment of periodontal inflammation. *Clin Chim Acta*. 2014;436:176-180. doi:10.1016/j.cca.2014.05.021
85. Corey-Bloom J, Haque A, Aboufadel S, et al. Uric Acid as a Potential Peripheral Biomarker for Disease Features in Huntington's Patients. *Front Neurosci*. 2020;14:73. Published 2020 Mar 4. doi:10.3389/fnins.2020.00073

86. Costantini D., Oxidative stress ecology and the d-ROMs test: facts, misfacts and an appraisal of a decade's work, *Behav Ecol Sociobiol*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016, DOI 10.1007/s00265-016-2091-5
87. Cover TL (1996) The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 20: 241-246.
88. Daley TD, Armstrong JE. Oral manifestations of gastrointestinal diseases. *Can J Gastroenterol*. 2007 Apr;21(4):241-4. doi: 10.1155/2007/952673. PMID: 17431513; PMCID: PMC2657699.
89. Danese S, Cremonini F, Armuzzi A, Candelli M, Papa A, et al. (2001) 19. *Helicobacter pylori* CagA-positive strains affect oxygen free radicals generation by gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 36: 247-250.
90. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2004 Jul;3(5):394-400. doi: 10.1016/j.autrev.2004.03.002.
91. D'Angelo F, Felley C, Frossard JL. Calprotectin in Daily Practice: Where Do We Stand in 2017?. *Digestion*. 2017;95(4):293-301. doi:10.1159/000476062
92. de Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 2008, 9(3), 72-80.
93. De La Pen VA, Dios DP, Sierra RT. Relationship between lactate dehydrogenase activity in saliva and oral health status. *Arch Oral Biol* 2007;52:911-5.
94. de Oliveira GA, Cheng RYS, Ridnour LA, et al., Inducible Nitric Oxide Synthase in the Carcinogenesis of Gastrointestinal Cancers. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(18):1059-1077. doi:10.1089/ars.2016.6850
95. de Vries JHM, Dijkhuizen M, Tap P, Witteman BJM. Patient's Dietary Beliefs and Behaviours in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis*. 2019;37(2):131-139. doi:10.1159/000494022
96. Desai GS, Mathews ST. Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World J Diabetes*. 2014 Dec 15;5(6):730-8. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.730. PMID: 25512775; PMCID: PMC4265859.
97. Deuring JJ., Peppelenbosch MP., Kuipers EJ, van der Woude CJ, de Haar C; Impeded protein folding and function in active inflammatory bowel disease. *Biochem Soc Trans* 2011; 39 (4): 1107–1111. doi: <https://doi.org/10.1042/BST0391107>
98. Deuring JJ, de Haar C, Koelewijn CL, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ. Absence of ABCG2-mediated mucosal detoxification in patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):87-93. doi: 10.1042/BJ20111281.
99. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, et al. (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192: 5002–5017 doi: 10.1128/JB.00542-10 [PMC free article
100. Dhaliwal AS, Bajwa AK, DhaliwalAK, AulakhSS. Women Oral Health Issues and Community Based Prevention. *Int J Dent Med Res* 2015;1(5):139-143.
101. Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, et al. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 1998;186:416–421.
102. Ding SZ, Minohara Y, Fan XJ, et al. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):4030-9. doi: 10.1128/IAI.00172-07.
103. d'Ischia M, Napolitano A, Manini P, Panzella L. Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and

- toxicological implications. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(12):2071-2092. doi:10.1021/tx2003118
104. Dodwad R, Betigeri AV, Preeti B P. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent* 2011;2:17-20
 105. Dorion, R. (Ed.). (2011). *Bitemark Evidence*. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b10520>
 106. Dovhanj J, Kljaić K, Dodig-Curković K, Curković M, Volarević M, et al. 4. (2009) *Helicobacter pylori*, zinc and iron in oxidative stress-induced injury of gastric mucosa. *Mini Rev Med Chem* 9: 26-30.
 107. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* 2006;27(3):147-159.
 108. Dudeney T.P., Crohn's disease of the mouth, *Proc. Roy. Soc. Med.*, 62 (1969), p. 1237
 109. Dudzińska E, Gryzinska M, Ognik K, Gil-Kulik P, Kocki J. Oxidative Stress and Effect of Treatment on the Oxidation Product Decomposition Processes in IBD. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7918261. Published 2018 Jul 2. doi:10.1155/2018/7918261
 110. Dykhuizen, R.S. , A. Fraser, H. McKenzie, M. Golden, C. Leifert and N. Benjamin. 1998 *Helicobacter pylori* killed by nitrite under acidic conditions. *Gut* 42:334–337..
 111. Dykhuizen, RS., A.Fraser, C. Duncan, M. Golden, N. Benjamin and C. Leifert. 1999. Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: the importance of dietary nitrate in host defense, p. 295 –316.
 112. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):271-279. doi:10.1007/s10875-012-9771-3
 113. Ebrahimi-Rad M, Khatami S, Ansari S, et al. Adenosine Deaminase 1 as a Biomarker for Diagnosis and Monitoring of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Biochem.*37(2), 128–133 (2018). doi:10.1515/jomb-2017-0042
 114. Ehab M. M. Ali1, Soha M. Hamdy and Tarek M. Mohamed, Nitric Oxide Synthase and Oxidative Stress: Regulation of Nitric Oxide Synthase Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects 25, April, 2012
 115. Eliasson L, Birkhed D, Osterberg T, Carlén A. Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and the elderly. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6):494-9
 116. El-Kareem MA., Omar HM., Amen A and Al-Zoheeret Y, Correlation between inflammatory markers, endoscopic findings and histopathological diagnosis in cases of ulcerative colitis *AAMJ*, Vol.4, N. 1, January, 2006
 117. Engstrom J, Arvamtakis C, Sagawa A, et al. Secretory immunoglobulin deficiency in a family with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1978;74:747-51.
 118. Erez A, Shental O, Tchebiner JZ, et al. Diagnostic and prognostic value of very high serum lactate dehydrogenase in admitted medical patients. *Isr Med Assoc J.* 2014;16(7):439-443.
 119. Eveson JW. Xerostomia. *Periodontol* 2000. 2008;48:85-91. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00263.x.Rezaie и сътр. (2006)
 120. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4295-4320. doi:10.3390/ijms13044295
 121. Fengming Y Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers.* 2014;2014:710915. doi:10.1155/2014/710915

122. Fenoll-Palomares C, Muñoz Montagud JV, Sanchiz V, et al. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004;96(11):773-783. doi:10.4321/s1130-01082004001100005
123. Finamore, A.; Peluso, I.; Cauli, O. Salivary Stress/Immunological Markers in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8562.
124. Flores SE, Aitchison A, Day AS, Keenan JI. Helicobacter pylori infection perturbs iron homeostasis in gastric epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184026. Published 2017 Sep 5. doi:10.1371/journal.pone.0184026
125. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
126. Francavilla R, Ercolini D, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Filippis F, De Pasquale I, Di Cagno R, Di Toma M, Gozzi G, et al. Salivary microbiota and metabolome associated with celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(11):3416-2522
127. Fredholm, B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14, 1315–1323 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132>
128. Fukuhara K., Osugi H., Takemura M., Lee S., Morimura K., Kishida S. et al. 2008, Helicobacter pylori induces gastritis and oxidative stress after distal gastrectomy. *Hepatology*, 5585148414860172-6390
129. Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, Abe Y. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res.* 2011;34(9):1041-1045. doi:10.1038/hr.2011.76
130. Ghotaslou R, Leylabadlo HE, Asl YM. Prevalence of antibiotic resistance in Helicobacter pylori: A recent literature review. *World J Methodol.* 2015;5(3):164-174. Published 2015 Sep 26. doi:10.5662/wjm.v5.i3.164
131. Gillum T, Kuennen M, Miller T, Riley L (2014) The effects of exercise, sex, and menstrual phase on salivary antimicrobial proteins. *Exerc Immunol Rev* 20: 23-38.
132. Gomina M, Badirou L, Akpona SA. Activity of Serum and Salivary α -Amylase in Habitual Adult Tobacco Consumers. *Biochem Anal Biochem.* 2013;2:140.
133. González-Hernández JM, Franco L, Colomer-Poveda D, et al. Influence of Sampling Conditions, Salivary Flow, and Total Protein Content in Uric Acid Measurements in Saliva. *Antioxidants.* 2019; 8(9):389. <https://doi.org/10.3390/antiox8090389>
134. Goodson P, Bui ER, Dunsmore SC. (2006) Self-esteem and adolescent sexual behaviors, attitudes, and intentions: A systematic review. *Journal of Adolescent Health* 38: 310–319.
135. Goud EVSS, Kannan R, Rao UK, Joshua E, Tavaraja R, Jain Y. Identification of Helicobacter pylori in saliva of patients with and without gastritis by polymerase chain reaction. *J Pharm Bioall Sci* 2019;11:S523-9.
136. Graham DY, Malaty R, Goodgame R, Ou CN (1996) Effect of cure of H. pylori infection on the gastric mucosal permeability. *Gastroenterology* 110: 122
137. Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav.* 2007;92(4):583-590. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.004]
138. Greabu M, Battino M, Mohora M et al. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life*, 2009, 2(2), 124-132.6.
139. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A

- Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res*. 2016;119(5):e39-e75. doi:10.1161/RES.000000000000110
140. Groeger S, Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2019;10:208. Published 2019 Feb 14. doi:10.3389/fimmu.2019.00208
 141. Gröschl M. Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire [Current status of salivary hormone analysis]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009;67(5):493-504. doi:10.1684/abc.2009.0357
 142. Guan G, Lan S. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1290179. Published 2018 May 9. doi:10.1155/2018/1290179
 143. Guihot G, Guimbaud R, Bertrand V, et al., Chaussade Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. *Amino Acids*. 2000;18(3):229-37. doi:10.1007/s007260050020
 144. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I, Physiology, Acute Phase Reactants. In: *Stat Pearls Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2020* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570/>
 145. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* 2013; 92(6):485-91; <http://dx.doi.org/10.1177/0022034513487559>
 146. Hanioka T, Morita M, Yamamoto T, et al. Smoking and periodontal microorganisms. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019;55(1):88-94. doi:10.1016/j.jdsr.2019.03.002
 147. Hasan HR, Aburahma N. N. A, AL-Kazaz A. K. A. Proteins Level in Sera and Saliva of Type2 Diabetic Iraqi Patients with and Without Proliferative Diabetic Retinopathy. *Orient J Chem* 2017;33(6).
 148. Hasan HR, Ghadhban JM, Abudal Kadhum ZI. Salivary ceruloplasmin ferroxidase & oxidase activities in celiac patients. *Int J Biomed Sci*. 2012;8(3):163-170.
 149. Hasan HR, Jabir RJ. Salivary and serum α -amylase activity and their correlations with oxidative stress index among different Iraqi smokers groups. *MOJ Addict Med Ther*. 2017;4(1):224–230. DOI: 10.15406/mojamt.2017.04.00071
 150. Hegde M., Rai K., and Padmanabhan V., “Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries,” *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, vol. 33, no. 3, pp. 231–234, 2009.
 151. Hensten A, Jacobsen N (2019) Salivary Alpha Amylase as a Stress Biomarker. *OSP J Dent Sci 1: JDS-1-103*
 152. Hettegger P, Huber J, Paßecker K, et al. High similarity of IgG antibody profiles in blood and saliva opens opportunities for saliva based serology. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218456. Published 2019 Jun 20. doi:10.1371/journal.pone.0218456
 153. Hezel MP, Weitzberg E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. *Oral Dis*. 2015;21(1):7-16. doi:10.1111/odi.12157
 154. Hohensinn B, Haselgrübler R, Müller U, et al. Sustaining elevated levels of nitrite in the oral cavity through consumption of nitrate-rich beetroot juice in young healthy adults reduces salivary pH. *Nitric Oxide*. 2016;60:10-15. doi:10.1016/j.niox.2016.08.006
 155. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Kollen BJ, et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin for Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Primary Care: A Prospective Cohort Study. *Ann Fam Med*. 2016 Sep;14(5):437-45. doi: 10.1370/afm.1949.
 156. Hu Approaching a complete repository of sequence-verified protein-encoding clones for *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 17(4):536-43
 157. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, Wexler LH, Gorlick R, Meyers P, Ladanyi M. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous

- deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20;23(3):548-58. doi:
158. Humphrey S.P., R.T. Williamson. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet. Dent.*, 85 (2001), pp. 162-169]
 159. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001 Feb;85(2):162-9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778. PMID: 11208206.
 160. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, et al Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 438–42.
 161. Ikonomi E, Rothstein RD, Ehrlich AC, FriedenberG FK. Measurement of Fractional Exhaled Nitric Oxide as a Marker of Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroenterol Pancreatol Liver Disord.* 2016;3(1):10.15226/2374-815X/3/1/00146. doi: 10.15226/2374-815X/3/1/00146.)
 162. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *J Med Life*, 2009, 2(3), 303-307.
 163. Isaksen B, Fagerhol MK. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Mol Pathol.* 2001;54(5):289-292. doi:10.1136/mp.54.5.289
 164. Ito Y, Nakamura A, Adachi M, et al. (2009) Blood oxidative stress levels and urinary dopamine values reflect the impact of academic stress on rodents. *J Anal Bio-Sci* 32:422–426
 165. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GA et al. A study of salivary lactate dehydrogenase isoenzyme levels in patients with oral leukoplakia and squamous cell carcinoma by gel electrophoresis method. *Braz Oral Res.*, 2010, 24(1) S39-S44.
 166. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GA, Vazirinejad R. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz Oral Res.* 2010;24(1):21-27. doi:10.1590/s1806-83242010000100004
 167. Jahanshahi G., Motavasel V., Rezaie A., Hashtroudi A.A., Daryani N.E., Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.* 2004;49:1752–1757. doi: 10.1007/s10620-004-9564-5.
 168. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(1):66-75. doi:10.1016/j.jobcr.2015.08.006
 169. Jenkinson HF, Lamont RJ (2005) Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 13: 589–595. Rafael Roda (2007)
 170. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Front Microbiol.* 2020;11:66. Published 2020 Jan 29. doi:10.3389/fmicb.2020.00066
 171. Johannsen A , ForeD MC , Håkansson Jet al. Consumption of dental treatment in patients with inflammatory bowel disease, a register study . *Plos One* . 2015;10 :e0134001.
 172. Johnson JA., Chinese medical qigong therapy volume 3, The International Institute of Medical Qigong USA 2002
 173. Justino AB, Teixeira RR, Peixoto LG, Jaramillo OLB, Espindola FS. Effect of saliva collection methods and oral hygiene on salivary biomarkers. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017;77(6):415-422. doi:10.1080/00365513.2017.1334261
 174. Kälvegren H, Fridfeldt J, Bengtsson T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *Eur J Cell Biol.* 89(6), 462-7 (2010).

175. Kander MC, Cui Y, Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):1024-1032. doi:10.1111/jcmm.13038
176. Kang DH and Ha SK •Uric Acid Puzzle: Dual Role as Anti-oxidant and Pro-oxidant, *Electrolyte Blood Press* 12:1-6, 2014 [Http://Dx.Doi.Org/10.5049/Ebp.2014.12.1](http://Dx.Doi.Org/10.5049/Ebp.2014.12.1).
177. Kang, J., & Kho, H. (2019). Blood contamination in salivary diagnostics: current methods and their limitations, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57(8), 1115-1124. doi: <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0739>
178. Karthik R, Karthik KS, David C, Ameerunnisa, Keerthi G. Oral adverse effects of gastrointestinal drugs and considerations for dental management in patients with gastrointestinal disorders. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S239-S241. doi:10.4103/0975-7406.100217
179. Kaufman E, Lamst IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.
180. Kawamoto A., Sugano N., Motohashi M., Matsumoto S., and Ito K., “Relationship between salivary antioxidant capacity and phases of the menstrual cycle,” *Journal of Periodontal Research*, vol. 47, no. 5, pp. 593–598, 2012.
181. Kelder, J. H. Stroeve, S. Bijlsma, M. Radonjic, and G. Roeselers, “Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health,” *Nutrition & Diabetes*, vol. 4, article e122, 2014.
182. Keremi B, Beck A, Fabian TK, et al. Stress and Salivary Glands., *Curr Pharm Des.* 2017 Oct 30;23(27):4057-4065. doi: 10.2174/1381612823666170215110648
183. Keshet R, Boursi B, Maoz R, et al. Diagnostic and prognostic significance of serum C-reactive protein levels in patients admitted to the department of medicine. *Am J Med Sci* 2009; 337: 248-55.12.
184. Khan N, Patel D, Shah Y, et al. Albumin as a prognostic marker for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2017 Dec 7;23(45):8008-8016. doi: 10.3748/wjg.v23.i45.8008.
185. Khodadadi I. Mini review from the molecular base to the diagnostic value of adenosine deaminase. *Avicenna J Med Biochem.* 2(2), e24310 (2014).
186. Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Netw* 2017;17:25-40 (PMID: 28261018)
187. Kinoshita Y, Kato M, Fujishiro M, et al. Efficacy and safety of twice-daily rabeprazole maintenance therapy for patients with reflux esophagitis refractory to standard once-daily proton pump inhibitor: the Japan-based EXTEND study. *J Gastroenterol.* 2018 Jul;53(7):834-844. doi: 10.1007/s00535-017-1417-z. Epub 2017 Nov 29.
188. Kiss O, Tokes AM, Spisak S, et al. MicroRNA-profiling in breast- and salivary gland-derived adenoid cystic carcinomas. *Orv Hetil* 2013; 154:963-968
189. Klatt, P., & Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928–4944.46 Ridnour et al. (2004).
190. Klein H. Cellular Elements in the Saliva of Infants before and after Eruption of Teeth, *Journal of Dental Research*, 1962 Volume: 41 issue: 5, page(s): 1017-1020
191. Klein H. Cellular Elements in the Saliva of Infants before and after Eruption of Teeth, *Journal of Dental Research*, 1962 Volume: 41 issue: 5, page(s): 1017-1020
192. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 (Pt 2):249-58.

193. Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med.* 2002 Jul;96(7):530-5. doi: 10.1053/rmed.2002.1312.
194. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2015;8:29-44. Published 2015 May 6. doi:10.4137/CGast.S20612
195. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2004 Sep;49(9):1433-7. doi: 10.1023/b:ddas.0000042242.22898.d9.
196. Kruidenier L., Kuiper I., van Duijn W., et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 2003;201:17–27
197. Krushna Kishore P, Yuvarajparmar D, Satishkumar S. Evaluating the levels of salivary enzymes as biochemical markers in periodontal disease. *Int J of Healthcare and Biomed Res,* 2(3), 170-174. (33 Conrad et al. 2002).
198. Krzystek-Korpacka M, Kempniński R, Bromke MA, Neubauer K. Oxidative Stress Markers in Inflammatory Bowel Diseases: Systematic Review. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(8):601. Published 2020 Aug 17. doi:10.3390/diagnostics10080601
199. Kubala E, Strzelecka P, Grzegocka M, et al. A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment. *Biomed Res Int.* 2018;2018:6572381. Published 2018 May 9. doi:10.1155/2018/6572381
200. Kuna AT. Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem Med (Zagreb).* 2013;23(1):28-42. doi: 10.11613/bm.2013.006.
201. Kutukculer N, Aydogdu S, Caglayan S, Yagci RV. Salivary and gastric fluid secretory immunoglobulin A and free secretory component concentrations in children with *Helicobacter pylori*-positive gastritis. *J Trop Pediatr.* 1998 Jun;44(3):178-80. doi: 10.1093/tropej/44.3.178. PMID: 9680788.
202. Lamacchia O, Fontana A, Pacilli A, et al. (2017) 28. On the non-linear association between serum uric acid levels and all-cause mortality rate in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 260: 20-26.
203. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults *Gut* 2019;68:s1-s106.
204. Lampignano R, Kloten V, Krahn T, Schlange T. Integrating circulating miRNA analysis in the clinical management of lung cancer: Present or future?. *Mol Aspects Med.* 2020;72:100844. doi:10.1016/j.mam.2020.100844
205. Lankarani KB, Sivandzadeh GR, Hassanpour S. Oral manifestation in inflammatory bowel disease:a review. *World J Gastroenterol.* 2013;19(46):8571-8579. doi:10.3748/wjg.v19.i46.8571.
206. Larijani Diagnostic. Value of Adenosine Deaminase and Its Isoforms in Type II Diabetes Mellitus. *Enzyme Res.* 2016, 9526593 (2016). doi: 10.1155/2016/9526593
207. Lee HK, Kim H, Kim HK, et al. The relationship between gastric juice nitrate/nitrite concentrations and gastric mucosal surface pH. *Yonsei Med J.* 2012;53(6):1154-1158. doi:10.3349/ymj.2012.53.6.1154
208. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.,* 2009, 22(4), 241–248.

209. Lettrichová I, Tóthová L., Hodosy J., Behuliak M., and Celec P., “Variability of salivary markers of oxidative stress and antioxidant status in young healthy individuals,” *Redox Report*, 2015.
210. Li C, Hsieh MC, Chang SJ (2013) Metabolic syndrome, diabetes, and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol* 25: 210-216.
211. Li CQ., Pignatelli B., Ohshima H. Increased oxidative and nitrative stress in human stomach associated with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* infection and inflammation. *Dig Dis Sci*, (2001)4648368440163-2116
212. Li LF, Chan RL, Lu L, Shen J, Zhang L, Wu WK, et al. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (review). *Int J Mol Med* (2014) 34:372–80.10.3892/ijmm.2014.1786
213. Li M, Gu L, Yang J, Lou Q. Serum uric acid to creatinine ratio correlates with β -cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018;34(5):e3001.
214. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772. Published 2018 Apr 26. doi:10.2147/CIA.S158513
215. Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis*. 2010;14(3):e184-e188. doi:10.1016/j.ijid.2009.04.022
216. Liverani E, Scaioli E, Digby RJ, Bellanova M, Belluzzi A. How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 21;22(3):1017-33. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1017.
217. Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, et al. Rectal nitric oxide as biomarker in treatment of inflammatory bowel disease: Responders versus nonresponders. *World J Gastroenterol*. 2006;12(21):3386–3392. doi: 10.3748/wjg.v12.i21.3386.
218. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F et al. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(12):e641-51. doi: 10.1016/j.crohns.2013.05.005.
219. Lu LJ, Hao NB, Liu JJ, Li X, Wang RL. Correlation between *Helicobacter pylori* Infection and Metabolic Abnormality in General Population: A Cross-Sectional Study. *Gastroenterol Res Pract*. 2018; 2018:7410801. doi:10.1155/2018/7410801
220. Lu, W., Xu, Y., Shao, X. et al. Uric Acid Produces an Inflammatory Response through Activation of NF- κ B in the Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Metabolic Disorders. *Sci Rep* 5, 12144 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep12144>
221. Luceri C, Bigagli E, Agostiniani S, et al. Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn's Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Sep 6;8(9):378. doi: 10.3390/antiox8090378.
222. Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Plasma malondialdehyde is induced by smoking: a study with balanced antioxidant profiles. *Br J Nutr*. 2004;92(2):203-206. doi:10.1079/BJN20041191
223. Lyngdoh T, Marques-Vidal P, Paccaud F, et al. Elevated serum uric acid is associated with high circulating inflammatory cytokines in the population-based Colaus study. *PLoS One*. 2011;6(5):e19901. doi: 10.1371/journal.pone.0019901. Epub 2011 May 20
224. Ma L, Hu L, Feng X, Wang S. Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging Dis*. 2018;9(5):938-945. Published 2018 Oct 1. doi:10.14336/AD.2017.1207
225. Maciejczyk M, Zalewska A, Ładny JR. Salivary Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Proteins and Lipids in Healthy Children, Adults, and the Elderly. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:4393460. Published 2019 Dec 5. doi:10.1155/2019/4393460

226. Malamud, D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am.*, 2011, 55(1), 159-178.
227. Malferteiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al., European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017 Jan;66(1):6-30. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27707777.
228. Mandel AL, Breslin PA. High endogenous salivary amylase activity is associated with improved glycemic homeostasis following starch ingestion in adults. *J Nutr*. 2012;142(5):853-858. doi:10.3945/jn.111.156984
229. Mantis NJ, Forbes SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):383-406. doi:10.3109/08820131003622635
230. Maor I, Rainis T, Lanir A, et al. Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci* 2008;53:2208–14.
231. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1998, 62(1), 71-109.
232. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent*. 2012;4(4):e237-e243. Published 2012 Oct 1. doi:10.4317/jced.50865
233. Martínez AD, Ruelas L, Granger DA. Association between body mass index and salivary uric acid among Mexican-origin infants, youth and adults: Gender and developmental differences. *Dev Psychobiol*. 2017;59(2):225-234. doi:10.1002/dev.21492
234. Medina ML, Medina MG, Merino LA (2017) Correlation between virulence markers of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric biopsies. *Arq Gastroenterol* 54: 217-221.
235. Mei H, Tu H. Vitamin C and *Helicobacter pylori* Infection: Current Knowledge and Future Prospects. *Front Physiol*. 2018;9:1103. Published 2018 Aug 14. doi:10.3389/fphys.2018.01103
236. Mendoza JL, Abreu MT. Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009 Jun;33(Suppl 3):S158–73.
237. Meyer P, Zechel T. Quantitative studies of lysozymes and phosphohexose isomerase in mixed saliva in oral squamous epithelial carcinoma. *HNO*, 2001, 49(8), 626-629.
238. Miller CS, Foley JD, Bailey AL et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.*, 2010, 4(1), 171-189.
239. Mind-Body Medicine 2009; Why Your Saliva May be the Real Reason You Have Digestive Issues; <https://taoofmedicine.com/jade-saliva- taoist-way-of-chewing-and-its-benefit/>
240. Mirvish S S; Reimers, K J; Kutler, B; et al. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time., *European Journal of Cancer Prevention*: October 2000 - p 335-342
241. Mitsuyama K, Niwa M, Takedatsu H, et al. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 21;22(3):1304-10. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1304
242. Mittal S., Bansal V., Garg S., Atreja G., Bansal S., The diagnostic role of Saliva — A Review., *J Clin Exp Dent*. 2011;3(4):e314-20. doi:10.4317/jced.3.e314
243. M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2013;6:33-47. Published 2013 Aug 14. doi:10.4137/CGast.S12731

244. Mohamed R, Campbell JL, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med.* 2012;1(1):19. Published 2012 Sep 5. doi:10.1186/2001-1326-1-19
245. Möller MN, Rios N, Trujillo M, Radi R, Denicola A, Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem.* 2019;294(40):14776-14802. doi:10.1074/jbc.REV119.006136
246. Motamedi M, Mansour-Ghanaei F, Sariri R, Vesal M. Salivary enzymes in peptic ulcer disease. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2013;3(2):83-87. doi:10.1016/j.jobcr.2013.03.004
247. Muhvić-Urek M., Tomac-Stojmenović M., Mijandrušić-Sinčić B. Oral pathology in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2016;22:5655. doi: 10.3748/wjg.v22.i25.5655.
248. Mumolo MG, Bertani L, Ceccarelli L, et al. From bench to bedside: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol.* 2018;24(33):3681-3694. doi:10.3748/wjg.v24.i33.3681
249. Nagler R, Lischinsky S, Diamond E, Drigues N, Klein I, Reznick AZ. Effect of cigarette smoke on salivary proteins and enzyme activities. *Arch Biochem Biophys.* 2000;379(2):229-236. doi:10.1006/abbi.2000.1877
250. Nagler RM, Lischinsky S, Diamond E, Klein I, Reznick AZ. New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. *J Lab Clin Med.* 2001 May;137(5):363-9. doi: 10.1067/mlc.2001.114710. PMID: 11329534.
251. Naito Y, Yoshikawa T, Ando T, et al. (1992) Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients. *J Clin Gastroenterol* 14: S131-S134.
252. Nassar M, Hiraishi N, Islam MS, Otsuki M, Tagami J. Age-related changes in salivary biomarkers. *Journal of Dental Sciences.* 2014;9:85–90.
253. Nater UM, La Marca R, Florin L et al. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity -- associations with adrenergic activity. – *Psychoneuroendocrinology*, 2006, 31(1), 49-58.
254. Ndebi ME, Guimtsop YAT, Tamokou JD (2018) The assessment of risk factors, lipid profile, uric acid and alanine aminotransferase in Helicobacter pylori-positive subjects. *International Journal of Research in Medical Sciences* 6: 2889-2894.
255. Nguyen S. and. Wong D T. Cultural, Behavioral, Social, and Psychological Perceptions of Saliva: Relevance to Clinical Diagnostics, Saliva-Based Translational Research & Clinical Applications (StarCA) UCLA Dental Research Institute, UCLA School of Dentistry book, USA 2007:11-19
256. Nikolaos Chaliasos., et al. A Study of Intrafamilial H. pylori Transmission in Epirus: A Region of North-Western Greece. *EC Gastroenterology and Digestive System* 1.2 (2016): 43-50.
257. Noble, R. E. Salivary alpha-amylase and lysozyme levels: a non-invasive technique for measuring parotid vs submandibular/sublingual gland activity. *J Oral Sci.*, 2000, 42(2), 83-86.16
258. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;10(3):155-167.
259. Nunes LA, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. *Clin Biochem.* 2011 Dec;44(17-18):1440-4. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.09.012. Epub 2011 Oct 2. PMID: 21986592.

260. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):177-192. DOI: 10.11613/BM.2015.018.
261. O'Connor HJ, Schorah CJ, Habibzadeh N, Axon AT, Cockel R (1989) Vitamin C in the human stomach: relation to gastric pH, gastroduodenal disease, and possible sources. *Gut* 30: 436-442.
262. Okamoto R, Watanabe M. Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.*, 2016, 51(1), 11-21.
263. Onyesom I., Osioma E, Ifie E. J, Oweh OT ., Activities of Alpha Amylase in Serum and Saliva of Some Nigerian Cigarette Smokers, *Advances in Life Sciences* 2012, 2(1): 28-30 DOI: 10.5923/j.als.20120201.04
264. Oppenheim FG. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. *Helv Odontol Acta*. 1970;14:10–7. 57
265. Ouellet-Morin I, Danese A, Williams B, Arseneault L. Validation of a high-sensitivity assay for C-reactive protein in human saliva. *Brain Behav Immun*. 2011 May;25(4):640-6. doi: 10.1016/j.bbi.2010.12.020. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21236331.
266. Out D, Hall RJ, Granger DA, Page GG, Woods SJ. Assessing salivary C-reactive protein: longitudinal associations with systemic inflammation and cardiovascular disease risk in women exposed to intimate partner violence. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):543-551. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.019
267. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
268. Padmavathi B, Sharma S, Astekar M, Rajan Y, Sowmya G. Oral Crohn's disease. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 Sep;18(Suppl 1):S139-42. doi: 10.4103/0973-029X.141369. PMID: 25364165; PMCID: PMC4211224.
269. Pandey S, McLernon DJ, Scotland G, Mollison J, Wordsworth S, Bhattacharya S. Cost of fertility treatment and live birth outcome in women of different ages and BMI. *Hum Reprod*. 2014 Oct 10;29(10):2199-211. doi: 10.1093/humrep/deu184. Epub 2014 Jul 24
270. Pay JB, Shaw AM. Towards salivary C-reactive protein as a viable biomarker of systemic inflammation. *Clin Biochem*. 2019 Jun;68:1-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.04.006. Epub 2019 Apr 14. PMID: 30995442.
271. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016 Jan 28;1:15004. doi: 10.1038/sigtrans.2015.4. PMID: 29263891;
272. Peter N., Kevin K. J., and Shivashankara A. R., "Effect of alcohol withdrawal on glutathione S-transferase, total antioxidant capacity and amylase in blood and saliva of alcohol-dependent males," *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol. 7, no. 5, pp. 797–800, 2013.
273. Petersson J, Phillipson M, Jansson EA et al. Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292(3), G718-724
274. Petrušić N, Posavac M, Sabol I, Mravak-Stipetić M. The Effect of Tobacco Smoking on Salivation. *Acta Stomatol Croat*. 2015;49(4):309-315. doi:10.15644/asc49/4/6
275. Phillips AC, Carroll D, Drayson MT, Der G. Salivary Immunoglobulin A Secretion Rate Is Negatively Associated with Cancer Mortality: The West of Scotland Twenty-07 Study. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145083doi:10.1371/journal.pone.0145083
276. Pich OQ, Merrell DS (2013) The ferric uptake regulator of *Helicobacter 18. pylori*: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. *Future Microbiol* 8: 725-738.

277. Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(8):1949-1967. doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.007
278. Piechota-Polanczyk A, Fichna J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(7):605-620. doi:10.1007/s00210-014-0985-1
279. Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, et al. Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 2001 Jun;76(6):593-9. doi: 10.4065/76.6.593. PMID: 11393497.
280. Plauth M, Jenss H, Meyle J. Oral manifestations of Crohn's disease. An analysis of 79 cases. *J Clin Gastroenterol.* 1991 Feb;13(1):29-37. doi: 10.1097/00004836-199102000-00008. PMID: 2007740.
281. Priadarsini T, Gayathri R, Vishnu Priya V. Evaluation of salivary total proteins, albumin, globulin, and A/G ratio among healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *Drug Invention Today*, 2018; 10(7): 1175-1178]
282. Pullishery F, Panchmal GS, Siddique S. Salivary Thiocyanate, Uric Acid and pH as Biomarkers of Periodontal Disease in Tobacco Users and Non-Users- An In-Vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(7):ZC47-ZC50. doi:10.7860/JCDR/2015/12783.6203
283. Punj A. Secretions of Human Salivary Gland, New Approaches in Diagnostics and Treatment DOI: 10.5772/intechopen.75538 2018
284. Pushpass RG, Daly B, Kelly C, Proctor G, Carpenter GH. Altered Salivary Flow, Protein Composition, and Rheology Following Taste and TRP Stimulation in Older Adults. *Front Physiol.* 2019;10:652. Published 2019 May 31. doi:10.3389/fphys.2019.00652
285. Qiu F, Liang CL, Liu H, et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?. *Oncotarget.* 2017;8(1):268-284. doi:10.18632/oncotarget.13613
286. Radin JN, González-Rivera C, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. *Helicobacter pylori* VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(7):2535-2543. doi:10.1128/IAI.01370-10
287. Rai B, Jain R, Anand SC, Kharb S. Salivary Lactate De-hydrogenase Isoenzymes in Oral Lichen planus. *Adv Med Dent Sci* 2008;2:1-3.
288. Rantonen PJF, Meurman JH (2000)21. Correlations between total protein, lysozyme, immunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. *Acta Odontol Scand* 58: 160-165.
289. Rao K, Babu SG, Shetty UA, Castelino RL, Shetty SR. Serum and salivary lactate dehydrogenase levels as biomarkers of tissue damage among cigarette smokers. A biochemical study. *Stomatologija.* 2017;19(3):91-96.
290. Rautava J, Pinnell LJ, Vong L, Akseer N, Assa A, Sherman PM. Oral Microbiome Composition Changes in Mouse Models of Colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 2(10): 12713.
291. Ravindranath V., Keerthilatha-M.P, Manoj Vengal, Kodyalamoole G, Dinesh N Usefulness of salivary alpha amylase as a biomarker of chronic stress and stress related oral mucosal changes – a pilot study *Journal section: Oral Medicine and Pathology* 2014;6(2):e132-7. doi:10.4317/jced.51355
292. Reenaers C, Bossuyt P, Hindryckx P, Vanpoucke H, Cremer A, Baert F. Expert opinion for use of faecal calprotectin in diagnosis and monitoring of inflammatory bowel disease in daily

- clinical practice. *United European Gastroenterol J.* 2018 Oct;6(8):1117-1125. doi: 10.1177/2050640618784046.
293. Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of "unstimulated" whole human saliva [published correction appears in *Clin Chem Lab Med* 2000 Oct;38(10):1081]. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(4):335-343. doi:10.1515/CCLM.2000.049
 294. Reinholdt J, Husby S. IgA and Mucosal Homeostasis, Madame Curie Bioscience Database. Austin, TX: Landes Bioscience; 2013.
 295. Reynolds PD, Middleton SJ, Hansford GM, Hunter JO. Confirmation of nitric oxide synthesis in active ulcerative colitis by infra-red diode laser spectroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9:463–466.
 296. Rezaie A, Ghorbani F, Eshgortk A, et al. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1091:110-122. doi:10.1196/annals.1378.060
 297. Rezaie A, Khalaj S, Shabihkhani M, et al. Study on the correlations among disease activity index and salivary transforming growth factor-beta 1 and nitric oxide in ulcerative colitis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1095:305-314. doi:10.1196/annals.1397.034
 298. Rezaie A., Parker R.D., AbdollahiM. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?. *Dig Dis Sci* 52, 2015–2021 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9622-2>
 299. Rieder G, Karnholz A, Stoeckelhuber M, Merchant JL, Haas R. H pylori infection causes chronic pancreatitis in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol.* 2007;13(29):3939-3947. doi:10.3748/wjg.v13.i29.3939
 300. Riis JL, Bryce CI, Matin MJ, et al. The validity, stability, and utility of measuring uric acid in saliva. *Biomark Med.* 2018;12(6):583-596. doi:10.2217/bmm-2017-0336
 301. Rijkschroeff P, Loos BG, Nicu EA. Impaired polymorphonuclear neutrophils in the oral cavity of edentulous individuals. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):371-378. doi:10.1111/eos.12367.
 302. Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J.* 2006;27(10):1174-1181. doi:10.1093/eurheartj/ehi879
 303. Saccucci M, Di Carlo G, Bossù M, Giovarruscio F, Salucci A, Polimeni A. Autoimmune Diseases and Their Manifestations on Oral Cavity: Diagnosis and Clinical Management. *J Immunol Res.* 2018;2018:6061825. Published 2018 May 27. doi:10.1155/2018/6061825
 304. Sahu GK, Upadhyay S, Panna SM. Salivary alpha amylase activity in human beings of different age groups subjected to psychological stress. *Indian J Clin Biochem.* 2014;29(4):485-490. doi:10.1007/s12291-013-0388-y [25]
 305. Said HS, Suda W, Nakagome S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res.* 2014;21(1):15-25. doi:10.1093/dnares/dst037
 306. Sakamoto M., Umeda M., Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J. Periodont. Res.* 2005;40:277–285.
 307. Salian V, Demeri F, Kumari S (2015) Estimation of salivary nitric oxide and uric acid levels in oral squamous cell carcinoma and healthy controls. *Clin Cancer Investig J* 4: 516-519
 308. *Salimetrics 2015 3rd Edition*
 309. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4128152. Published 2019 Nov 25. doi:10.1155/2019/4128152

310. Sautin YY., Johnson R J., Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox ,*Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Jun; 27(6): 608–619. doi: 10.1080/15257770802138558
311. Savage NW, Barnard K, Shirlaw PJ, et al. Serum and salivary IgA antibody responses to *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in orofacial granulomatosis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):483-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02394.x
312. Savica V, Calo L, Santoro D, et al. Salivary phosphate secretion in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2008;18(1):87–90.
313. Schaefer J.S., Attumi T., Opekun A.R., et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn’s disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol*. 2015;16:5. doi: 10.1186/s12865-015-0069-0.
314. Schiött CR, Loe H. The origin and change in number of leukocytes in the human saliva. *J Periodont Res*, 1970, 5(1), 36-41.
315. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Vavricka SR, Bruegger LE, Seibold F. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn’s disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:162–169.
316. Sculley D. V. and Langley-Evans S. C., “Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation,” *Clinical Science*, vol. 105, no. 2, pp. 167–172, 2003.
317. Shahbaz S, Katti G, Ghali SR, Katti C (2015) Evaluation of salivary albumin in diabetic children. *J NTR Univ Health Sci* 4: 253-256.DOI: 10.4103/2277-8632.171742.
318. Shaila M, Pai GP, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 2013; 17(1): 42-46
319. Shamsoddin E. A COVID-19 pandemic guideline in evidence-based medicine. *Evid Based Dent*. 2020;21(2):71-73. doi:10.1038/s41432-020-0105-7
320. Shamsoddin E. Saliva: a diagnostic option and a transmission route for 2019-nCoV. *Evid Based Dent*. 2020;21(2):68-70. doi:10.1038/s41432-020-0104-8
321. Sharan TS, Rajesh K. A new biochemical marker: serum adenosine deaminase activity for assessment of severity in ulcerative colitis patients. *International Journal of Medical Science and Education* 2014;1:86-92
322. Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*. 2018;4(1):42-66. Published 2018 Jan 12. doi:10.3934/microbiol.2018.1.42
323. Shilpashree and Sarapur. Evaluation of salivary immunoglobulin A levels in tobacco smokers and patients with recurrent aphthous ulcers. *J Nat Sci Biol Med*. 2012;3(2):177-181. doi:10.4103/0976-9668.101907.
324. Shirish P J and Someshwar G. A study of salivary lactate dehydrogenase isoenzyme levels in patients with oral leukoplakia and squamous cell carcinoma by gel electrophoresis method, *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 Sep; 18(Suppl 1): S39–S44. doi: 10.4103/0973-029X.141342
325. Singh SK, Gupta A, Rajan SY, et al. Correlation of presence of *Candida* and epithelial dysplasia in oral mucosal lesions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 2014 Oct;8(10):ZC31-5. DOI: 10.7860/jcdr/2014/9872.4956.
326. Sipponen P, Maaros HI. Chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(6):657-667. doi:10.3109/00365521.2015.1019918

327. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis.* (2008) 14:40–6. doi: 10.1002/ibd.20312
328. Skarar DN, Hossain I, Shoab AKM, Amin R. Adenosine Deaminase (ADA) in Tuberculous Meningitis. *Bangladesh J Medicine.* 25, 61 (2014).
329. Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(1):65-73.
330. Söder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2002; 29(5): 384-391
331. Solem CA, Loftus EV, Jr, Tremaine WJ, et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 Aug;11(8):707–12
332. Son SM. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. *Diabetes Metab J.* 2012;36(3):190-198. doi:10.4093/dmj.2012.36.3.190
333. Sonar SA, Lal G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol.* 2019;10:710. Published 2019 Apr 4. doi:10.3389/fimmu.2019.00710
334. Soukup M, Biesiada I, Henderson A, et al. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4(1):14. Published 2012 Apr 19. doi:10.1186/1758-5996-4-14
335. Spiceland CM, Lodhia N. Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2018 Sep 21;24(35):4014-4020. doi: 10.3748/wjg.v24.i35.4014.
336. Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J.* 2000;50(3):140-161. doi:10.1111/j.1875-595x.2000.tb00554.x.
337. Sri Santosh T, Parmar R, Anand H, Srikanth K, Saritha M. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus.* 2020;12(4):e7708. Published 2020 Apr 17. doi:10.7759/cureus.7708
338. Srivastava R, Kashyap A, Kumar M, Nath G, Jain AK (2013) Mucosal IgA & IL-1 β in *Helicobacter pylori* Infection. *Indian J Clin Biochem* 28: 19-23.
339. Straub R.H., Wiest R., Strauch U.G., Härle P., Schölmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut.* 2006;55:1640–1649. doi: 10.1136/gut.2006.091322.
340. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 2002 Mar;8(2), 69-76.
341. Streckfus CF, Kulasinghe A. *Advances in salivary diagnostics.* B. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015, 17-18.
342. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):1033. Published 2018 May 21. doi:10.3390/ijerph15051033
343. Su Q, Li X, Mo W, Yang Z. Low serum bilirubin, albumin, and uric acid levels in patients with Crohn's disease. *Medicine(Baltimore).* 2019; 98 (19): e15664. doi:10.1097/MD.00000000000015664)

344. Sundar NM, Krishnan V, Krishnaraj S, Hemalatha VT, Alam MN. Comparison of the salivary and the serum nitric oxide levels in chronic and aggressive periodontitis: a biochemical study. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(6):1223-1227. doi:10.7860/JCDR/2013/5386.3068
345. Szczeklik K., Krzyściak W., Cibor D., et al. Markers of lipid peroxidation and antioxidant status in the serum and saliva of patients with active Crohn disease. *Pol. Arch. Intern. Med.* 2018;128:362–370.
346. Taaheri J, Bakhshi M., Aryankia A., Noormohammadi R. Use of Saliva for Diagnosis of Diseases, *Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDA)* May 2014; Vol. 26, No. 1
347. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2017 Oct 2;5(4):e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
348. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1162. Published 2018. doi:10.3389/fphar.2018.01162
349. Tatarczak-Michalewska M, Flieger J, Kawka J, et al. HPLC-DAD Determination of Nitrite and Nitrate in Human Saliva Utilizing a Phosphatidylcholine Column. *Molecules.* 2019;24(9):1754. Published 2019 May 6. doi:10.3390/molecules24091754
350. Tham, Yuen Sau et al. “Fecal calprotectin for detection of postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis.” *Therapeutic advances in gastroenterology* vol. 11 1756284818785571. 8 Jul. 2018, doi:10.1177/1756284818785571
351. Thapa SD, Hadid H, Usman M, et al. Predictors of Thiopurine Treatment Failure in Biologic-Naïve Ulcerative Colitis Patients. *Dig Dis Sci.* 2016 Jan;61(1):230-7. doi: 10.1007/s10620-015-3864-9.
352. Theda, C., Hwang, S.H., Czajko, A. et al. Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Sci Rep* 8, 6944 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25311-0>
353. Tian S, Li J, Li R, Liu Z, Dong W. Decreased Serum Bilirubin Levels and Increased Uric Acid Levels are Associated with Ulcerative Colitis. *Med Sci Monit.* 2018;24:6298-6304. Published 2018 Sep 9. doi:10.12659/MSM.909692
354. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4535194. doi:10.1155/2017/4535194
355. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4535194. doi: 10.1155/2017/4535194.
356. Tian TT, Li H, Chen SJ, et al. Serum Uric Acid as an Independent Risk Factor for the Presence and Severity of Early-Onset Coronary Artery Disease: A Case-Control Study. *Dis Markers.* 2018;2018:1236837. Published 2018 Oct 23. doi:10.1155/2018/1236837
357. Tiwari M. Science behind human saliva. *J Nat Sci Biol Med,* 2011, 2(1), 53-58.
358. Torres P, Díaz J, Arce M et al. The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB J,* 2017, 31(11), 4946-49
359. Trotti R, Carratelli M, Barbieri M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med.* 2002;44(1):37-40.
360. Tsikas D. Measurement of nitrite in plasma and serum: still a challenging analytical task. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(11):2049-2051. doi:10.1515/cclm-2011-0946

361. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*. 2002;105(10):1155-1157. doi:10.1161/hc1002.105935
362. Tsukada K, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Predictive value of uric acid in gastric mucosal damage in hemodialysis patients. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(53):1708-1711.
363. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(4):227-237. doi:10.1155/S1110724304402034
364. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6(2):445-462. doi:10.3390/ijerph6020445
365. Välimaa H, Savolainen S, Soukka T, et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol*. 2004;180(1):55-62. doi:10.1677/joe.0.1800055
366. van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ*. 2010 Jul 15;341:c3369. doi: 10.1136/bmj.c3369.
367. Vassalle C, Maffei S, Boni C, Zucchelli GC. Gender-related differences in oxidative stress levels among elderly patients with coronary artery disease. *Fertil Steril*. 2008;89(3):608-613. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.03.052
368. Vassalle C, Sciarrino R, Bianchi S, et al Sex-related differences in association of oxidative stress status with coronary artery disease. *Fertil Steril*. 2012; 97: 414–9.
369. Vaziri PB, Vahedi M, Abdollahzadeh SH, Abdolsamadi HR, Hajilooi M, 24. et al. (2009) Evaluation of Salivary Albumin in Diabetic Patients Iranian J Publ Health 38: 54-59.
370. Vermeire S. Laboratory Markers in IBD: Useful, Magic, or Unnecessary Toys? *Gut*. (2006) 55:426–31. doi: 10.1136/gut.2005.069476
371. Vermeire S., Van Assche G., Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2004;10(5):661–665. doi: 10.1097/00054725-200409000-00026.
372. Vidović A, Vidović Juras D, Vučićević Boras V, et al. Determination of leucocyte subsets in human saliva by flow cytometry. *Arch Oral Biol*. 2012;57(5):577-583. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.10.015
373. Viennois E, Zhao Y, Merlin D. Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease: From Classical Laboratory Tools to Personalized Medicine. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(10):2467-2474. doi:10.1097/MIB.0000000000000444
374. Wagner S, Beil W, Westermann J, et al. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*. 1997 Dec;113(6):1836-47. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70003-9. PMID: 9394723.
375. Walt DR, Blicharz TM, Hayman RB, et al. Microsensor arrays for saliva diagnostics. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098(1):389-400. doi: 10.1196/annals.1384.031.
376. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol*. 2017;34(1):7. doi:10.1007/s12032-016-0863-4
377. Wasserman A, Shnell M, Boursi B, et al. Prognostic significance of serum uric acid in patients admitted to the department of medicine. *Am J Med Sci* 2010; 339: 5-21.

378. Watanabe, J. Effect of Roentgen Irradiation upon Cellular Elements in the Human Saliva, *Oral Surg., Oral Med., & Oral Pathol.*, 4:89, 1951.
379. Waterhouse JP, Chisholm DM, Winter RB, Patel M, Yale RS. Replacement of functional parenchymal cells by fat and connective tissue in human submandibular salivary glands: an age-related change. *J Oral Pathol.* 1973;2(1):16-27. doi:10.1111/j.1600-0714.1973.tb01670.x
380. Weemaes C, Klasen I, Göertz J, et al. Development of immunoglobulin A in infancy and childhood. *Scand J Immunol.* 2003;58(6):642-648. doi:10.1111/j.1365-3083.2003.01344.x
381. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2016 Feb 5;113(5):72-82. doi: 10.3238/arztebl.2016.0072.
382. Weiner D, Levy Y, Khankin EV, Reznick AZ. Inhibition of salivary amylase activity by cigarette smoke aldehydes. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 6:727-737.
383. Williams C, McColl KE. Review article: proton pump inhibitors and bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Jan 1;23(1):3-10. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02707.x. PMID: 16393275.
384. Wilson KT, Crabtree JE (2007) Immunology of *Helicobacter pylori*: 11. insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 133: 288-308.
385. Wolff B, Berger T, Frese C, et al. Oral status in patients with early rheumatoid arthritis: a prospective, case-control study. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(3):526-531. doi:10.1093/rheumatology/ket362
386. Xie H, Onsongo G, Popko J, et al. Proteomics analysis of cells in whole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(3):486-498. doi:10.1074/mcp.M700146-MCP200
387. Xu F, Laguna L, Sarkar A. Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding?. *J Texture Stud.* 2019;50(1):27-35. doi:10.1111/jtxs.12356
388. Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):11. Published 2020 Apr 17. doi:10.1038/s41368-020-0080-z
389. Xu X, Li C, Zhou P, Jiang T. Uric acid transporters hiding in the intestine. *Pharm Biol.* 2016 Dec;54(12):3151-3155. doi: 10.1080/13880209.2016.1195847.
390. Xu Y, Li Y, Scott K, Lindh CH, et al. Inflammatory bowel disease and biomarkers of gut inflammation and permeability in a community with high exposure to perfluoroalkyl substances through drinking water. *Environ Res.* 2020 Feb;181:108923. doi: 10.1016/j.envres.2019.108923.
391. Xu Z., Wei B., Qiu Y., Zhang T. Altered salivary alpha-amylase secretion in patients with ulcerative colitis
392. Yadav M et al. Evaluation of extracellular signal regulated kinase 1 expression in premalignant lesions of oral cavity. *International Surgery Journal* 2020 ;7 (12) 3965, DOI: <https://dx.doi.org/10.18203/2349-2902.isj20204978>
393. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients.* 2018;10(11):1618. Published 2018 Nov 2. doi:10.3390/nu10111618
394. Yamamoto K, Chiba T, Matsumoto T. Effect of tumor necrosis factor- α antagonists on oxidative stress in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21(35):10208-10214. doi:10.3748/wjg.v21.i35.10208

395. Yamauchi Y, Matsuno T, Omata K, Satoh T. Relationship between hyposalivation and oxidative stress in aging mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2017;61(1):40-46. doi:10.3164/jcbrn.16-79
396. Yang Z, Wang H, Guo P, et al. A Multi-Region Magnetoimpedance-Based Bio-Analytical System for Ultrasensitive Simultaneous Determination of Cardiac Biomarkers Myoglobin and C-Reactive Protein. *Sensors (Basel).* 2018;18(6):1765. Published 2018 Jun 1. doi:10.3390/s18061765
397. Yang ZM, Chen LH, Zhang M, et al. Age Differences of Salivary Alpha-Amylase Levels of Basal and Acute Responses to Citric Acid Stimulation Between Chinese Children and Adults. *Front Physiol.* 2015;6:340. doi:10.3389/fphys.2015.00340
398. Yasukawa K, Tokuda H, Tun X, Utsumi H, Yamada K. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Res.* 2012;46:1427–1436.
399. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(12):22529-22542. Published 2015 Dec 15.
400. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):781-791. doi:10.1128/CMR.00021-13
401. Yu Y, Cai J, Song Z, Wang J, Wu L. Association of *Helicobacter pylori* infection with metabolic syndrome in aged Chinese females. *Exp Ther Med.* 2019 Jun;17(6):4403-4408. doi: 10.3892/etm.2019.7509. Epub 2019 Apr 19. PMID: 31105780; PMCID: PMC6507522.
402. Yuan A, Woo SB. Adverse drug events in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015 Jan;119(1):35-47. doi: 10.1016/j.oooo.2014.09.009. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25442252.
403. Yuksel M, Ates I, Kaplan M, et al. Is Oxidative Stress Associated with Activation and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease?. *J Med Biochem.* 2017;36(4):341-348. Published 2017 Oct 28. doi:10.1515/jomb-2017-0013
404. Zhang QB, Nakashabendi IM, Mokhashi MS, et al. (1996) Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. *Gut* 38: 841-845.
405. Zhang Y, Sun J, Lin CC, Abemayor E, Wang MB, Wong DT. The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):38-52. doi:10.1111/prd.12099
406. Zhu F, Feng D, Zhang T, et al. Altered uric acid metabolism in isolated colonic Crohn's disease but not ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jan;34(1):154-161. doi: 10.1111/jgh.14356. Epub 2018 Jul 6. PMID: 29926959.
407. Zhu F, Feng D, Zhang T, Gu L, Zhu W, Guo Z, Li Y, Lu N, Gong J, Li N. Altered uric acid metabolism in isolated colonic Crohn's disease but not ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jan;34(1):154-161. doi: 10.1111/jgh.14356.
408. Ziskin de, Moulton R. A comparison of oral and vaginal epithelial smears. *J Clin Endocrinol Metab.* 1948;8(2):146-165. doi:10.1210/jcem-8-2-146
409. Zolotukhin, S. Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Oral Dis,* 2013, 19(3), 219-229.
410. Zong J, Sun Y, Zhang Y, et al. Correlation Between Serum Uric Acid Level and Central Body Fat Distribution in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:2521-2531

Библиография на кирилица

1. Брещенко Е.Е., Быков И.М. Биохимия полости рта, ротовой и десневой жидкостей, Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов стоматологического факультета, Краснодар 2018
2. Островский ОВ., Храмов ВА., Попова Т А, Биохимия полости рта : учеб. пособие /; под ред. проф. О. В. Островского. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 184 с.
3. Форумът, международната програма за определяне на прогностичните фактори при пациентите с възпалителни чревни заболявания (ВЧЗ) – IBD-Ahead.